

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.2024-06

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

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

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



Подписано в печать 31.12.2024

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.2024-06

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

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

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



Approved for print 31.12.2024

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

ОБЗОР	5
<hr/>	
Подходы к терапии синдрома Криглера–Найяра 1-го типа у детей М. С. Готье, А. В. Дегтярева, Д. Н. Дегтярев, Л. В. Ушакова, Е. А. Филиппова, М. Б. Албегова, А. С. Бавыкин, А. М. Савилова, С. И. Жданова	
Approaches to therapy of Crigler–Najjar syndrome type 1 in children Gautier MS, Degtyareva AV, Degtyarev DN, Ushakova LV, Filippova EA, Albegova MB, Bavykin AS, Savilova AM, Zhdanova SI	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	13
<hr/>	
Повышенная физическая нагрузка в условиях нормоксии вызывает идиопатическую кахексию у <i>Heterocephalus glaber</i> М. А. Адрианов, М. Ю. Бобров, И. З. Мамедов, В. Н. Манских, А. А. Рачкова, А. М. Шелехова, Ч. М. Эльдаров, О. А. Аверина, М. Ю. Высоких	
Increased physical activity under conditions of normoxia causes idiopathic cachexia in <i>Heterocephalus glaber</i> Adrianov MA, Bobrov M, Mamedov I, Manskih V, Rachkova AA, Shelekhova AM, Eldarov CM, Averina OA, Vysokikh MYu	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	19
<hr/>	
Рекомбинантный вирус осповакцины, экспрессирующий интерферон типа 1, как платформа для селективной иммунотерапии глиобластомы и меланомы Е. Р. Набережная, А. В. Соболева, П. О. Воробьев, В. В. Вадехина, Г. М. Юсубалиева, И. В. Исаева, В. П. Баклаушев, П. М. Чумаков, А. В. Липатова	
Interferon type I-expressing recombinant vaccinia virus as a platform for selective immunotherapy of glioblastoma and melanoma Naberezhnaya ER, Soboleva AV, Vorobyev PO, Vadekhina VV, Yusubalieva GM, Isaeva IV, Baklaushiev VP, Chumakov PM, Lipatova AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	29
<hr/>	
Влияние опухоли на клеточный цикл и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток А. А. Актанова, М. В. Быкова, И. П. Скачков, В. В. Денисова, Е. А. Пашкина	
Impact of tumor on the cell cycle and differentiation of hematopoietic stem cells Aktanova AA, Bykova MV, Skachkov IP, Denisova VV, Pashkina EA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	36
<hr/>	
Модифицированные микропробирки — перспективная основа для иммобилизации антител иммунозахвата на примере SARS-CoV-2 Е. О. Рубальский, Р. А. Абдрахманова, Г. Р. Баева, Т. С. Рубальская, М. В. Лазыко, С. В. Поройский, Д. В. Щебляков, И. А. Фаворская, В. А. Гушчин	
Modified micro test tubes as a promising basis for immobilization of antibodies for immunocapture on the example of SARS-CoV-2 Roubalskiy EO, Abdrahmanova RA, Baeva GR, Rubalskaya TS, Lazko MV, Poroykiy SV, Shechlyakov DV, Favorskaya IA, Gushchin VA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	42
<hr/>	
Цепочечность Т-клеточных рецепторов у первично активированных эффекторов и рестимулированных клеток памяти А. А. Калинина, М. В. Кубекина, Н. А. Персиянцева, А. В. Брутер, Л. М. Хромых, Д. Б. Казанский	
T-cell receptor chain centricity in the primarily activated effectors and re-stimulated memory cells Kalina AA, Kubekina MV, Persiyantseva NA, Bruter AV, Khromykh LM, Kazansky DB	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	50
<hr/>	
Генофонд Урало-Поволжья: генетическая история населения Мордовии по данным филогеографии гаплогруппы N3a1-Y23475 Y-хромосомы А. Т. Аджоян, Д. С. Адамов, А. Ю. Потанина, М. М. Воронина, И. О. Горин, А. Г. Штрунов-Шлыков, С. М. Кошель, Е. В. Балановская, Г. Ю. Пономарев	
Gene pool of the Ural-Volga region: genetic history of Mordovia's population based on the Y-chromosomal haplogroup N3a1-Y23475 phylogeography Aqzhoyan AT, Adamov DS, Potanina AYu, Voronina MM, Gorin IO, Shtrunov-Shlykov AG, Koshel SM, Balanovskaya EV, Ponomarev GYu	
МНЕНИЕ	57
<hr/>	
Перспективы генной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками Я. М. Валиева, К. В. Попов	
Prospects of gene therapy with hematopoietic stem cells Valieva YM, Popov KV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	61
<hr/>	
Транскрипционный профиль в предоперационном тесте ингибиторами ароматазы у больных раком молочной железы О. В. Бурменская, Д. Ю. Трофимов, В. В. Кометова, М. В. Родионова, В. В. Родионов	
Transcription profile in preoperative aromatase inhibitor response test in breast cancer patients Burmenskaya OV, Trofimov DYu, Kometova VV, Rodionova MV, Rodionov VV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	68
<hr/>	
Роль окислительного стресса в патогенезе остеодеструктивного синдрома у больных с хроническим лимфолейкозом М. В. Осиков, Е. А. Коробкин	
Role of oxidative stress in pathogenesis of bone destruction syndrome in patients with chronic lymphocytic leukemia Osikov MV, Korobkin EA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	75
<hr/>	
Микрореконструктивные технологии подшивания интраокулярной линзы к радужке с полным сохранением ее функций Х. П. Тахчиди	
Intraocular lens stitching to iris with full preservation of its functions: microreconstructive techniques Takhchidi Kh. P.	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	87
<hr/>	
Сравнительный анализ способов расчета торической интраокулярной линзы у пациентов после сквозной кератопластики М. В. Синецын, А. А. Воскресенская, Н. А. Поздеева	
Comparative analysis of methods for calculation of toric intraocular lenses in patients after penetrating keratoplasty Sinitsyn MV, Voskresenskaya AA, Pozdeyeva NA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	95
<hr/>	
Влияние эндовитреальной иллюминации на окислительные процессы в крови кроликов Р. Р. Ямгуддинов, Т. Р. Мухаммадиев, Р. Р. Ахмадиев, К. С. Мочалов	
Effect of endoillumination during vitrectomy on oxidative processes in rabbit blood Yamgudtinov RR, Mukhamadeev TR, Ahmadeev RR, Mochalov KS	

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	100
<hr/>	
Штаммы <i>Mycobacterium tuberculosis</i> с мутациями в <i>gyrA</i> различаются по уровню конкурентного фитнеса С. Н. Андреевская, Т. Г. Смирнова, Л. Н. Черноусова, Е. Е. Ларионова, Э. В. Севастьянова, В. В. Устинова, Е. А. Киселева, А. Эргешов	
Strains of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> with mutations in <i>gyrA</i> differ in their level of competitive fitness Andreevskaya SN, Smirnova TG, Chernousova LN, Lariovna EE, Sevastyanova EV, Ustinova VV, Kiselyova EA, Ergeshov A	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	107
<hr/>	
Воздействие литических бактериофагов семейств <i>Herelleviridae</i> и <i>Rountreeviridae</i> на биопленки <i>Staphylococcus aureus</i> Н. К. Абдраимова, Е. А. Шитиков, М. В. Малахова, Р. Б. Городничев, М. А. Корниенко	
Effects of lytic bacteriophages of the families <i>Herelleviridae</i> and <i>Rountreeviridae</i> on the <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms Abdraimova NK, Shitikov EA, Malakhova MV, Gorodnichev RB, Kornienko MA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	114
<hr/>	
Оценка эффективности этиотропной терапии линезолидом и бактериофагом на мышинной модели стафилококковой инфекции М. А. Корниенко, В. В. Кузин, К. Н. Абдраимова, Р. Б. Городничев, Е. А. Шитиков	
Evaluation of the effectiveness of etiotropic therapy with linezolid and bacteriophage in a mouse model for staphylococcal infection Kornienko MA, Kuzin VV, Abdraimova NK, Gorodnichev RB, Shitikov EA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	123
<hr/>	
Комплексное антибактериальное действие ферментов на биопленки <i>Staphylococcus aureus</i> А. А. Загоскин, Р. А. Авакова, Л. Ф. Резвык, М. В. Захарова, Э. К. Мубаракшина, Р. А. Иванов, М. О. Нагорных	
Complex antibacterial action of enzymes acting on <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms Zagoskin AA, Avakova, Rezvykh LF, Zakharova MV, Mubarakshina EK, Ivanov RA, Nagornyykh MO	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	132
<hr/>	
Сравнительный анализ результатов ВПЧ-тестирования в образцах цервикального эпителия и биопсийного материала шейки матки Г. Р. Байрамова, Д. Ю. Трофимов, А. О. Андреев, О. В. Бурменская, А. В. Асатурова, В. Д. Пивень	
Comparative analysis of the results of testing cervical epithelial samples and cervical biopsy specimens for HPV Bayramova GR, Trofimov DYU, Andreev AO, Bourmenskaya OV, Asaturova AV, Piven VD	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	139
<hr/>	
Взаимосвязь между бактериями-эпibiотами <i>Nanosynbacter lyticus</i> и воспалительными заболеваниями пародонта Л. В. Побожьева, Г. А. Скворцов-Игралов, Ю. А. Бочарова, И. С. Копецкий, И. В. Чеботарь	
Association between the <i>Nanosynbacter lyticus</i> epibiotic bacteria and inflammatory periodontal diseases Pobozhieva LV, Skvortsov-Igralov GA, Bocharova YuA, Kopetskiy IS, Chebotar IV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	144
<hr/>	
Оценка эффекта гипотермии после моделированной ишемической гипоксической энцефалопатии по метаболиту крови Ч. М. Эльдаров, Н. Л. Стародубцева, Ю. А. Шевцова, К. В. Горюнов, О. В. Ионов, Д. Н. Силачев	
Assessment of the effect of hypothermia after simulated hypoxic ischemic encephalopathy based on blood metabolome Eldarov CM, Starodubtseva NL, Shevtsova YuA, Goryunov KV, Ionov OV, Silachev DN	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	152
<hr/>	
Опыт внедрения протокола у детей с риском инвазивного микоза ECMM EQUAL Scores У. В. Лукаш, А. В. Власова, В. В. Горев, О. А. Тиганова, А. А. Быстрова, М. М. Каменев, К. А. Хасанова, Н. П. Денисенко, Д. А. Сычев	
Experience of implementation of ECMM EQUAL Scores in treatment of children at risk of invasive mycosis Lukash UV, Vlasova AV, Gorev VV, Tiganova OA, Bystrova AA, Kamenev MM, Khasanova KA, Denisenko NP, Sychev DA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	159
<hr/>	
Исследование дисфункции нижних мочевыводящих путей у женщин с рассеянным склерозом Е. И. Лузанова, М. И. Карпова, О. С. Абрамовских, Е. А. Четвернина, С. В. Куприянов, М. А. Зотова, А. В. Бершадский	
Assessment of lower urinary tract dysfunction in women with multiple sclerosis Luzanova EI, Karpova MI, Abramovskikh OS, Chetvernina EA, Kupriyanov SV, Zotova MA, Bershadskiy AV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	167
<hr/>	
Синергическая эффективность низкоинтенсивной экстракорпоральной ударно-волновой терапии и обогащенной тромбоцитами плазмы при эректильной дисфункции Й. Ч. Ли, Т. Д. Янг, У. Ч. Чен, Н. К. Дуби, Х. Чатурведи, А. Ч. Хуанг, Ч. Х. Чанг, Ч. Ч. Лин, М. Ч. Лю	
Synergistic efficacy of low-intensity extracorporeal shock wave and platelet-rich plasma on erectile dysfunction Lee YC, Yang TD, Chen WC, Dubey NK, Chaturvedi H, Huang AC, Chang CH, Lin CC, Liu MC	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	175
<hr/>	
Динамика маркеров воспаления на начальных стадиях хронической болезни почек при сахарном диабете 1-го типа М. В. Осиков, Л. А. Эфрос, Л. Ю. Журавлева, А. А. Федосов	
Dynamic changes of inflammatory markers in the early stages of chronic kidney disease in patients with type 1 diabetes mellitu Osikov MV, Efros LA, Zhuravleva LYU, Fedosov AA	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	186
<hr/>	
Оценка влияния хронического радиационного воздействия на потерю теломерных участков хромосом в Т-лимфоцитах у женщин Я. В. Кривошапова	
Estimation of the impact of chronic radiation exposure on telomere loss in women's T lymphocytes Krivoshapova IaV	
ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ	194
<hr/>	
Анализ возможностей метода оценки кривой «поток–объем» по изменению ее формы при обструкции бронхов Е. М. Десяцкова, В. В. Греченко, В. В. Соболева	
Analysis of the possibilities of the flow-volume curve assessment by the changes in its shape in patients with obstructive airway diseases Desyatskova EM, Grechenko VV, Soboleva VV	

ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ СИНДРОМА КРИГЛЕРА–НАЙЯРА 1-ГО ТИПА У ДЕТЕЙ

М. С. Готьё✉, А. В. Дегтярева, Д. Н. Дегтярев, Л. В. Ушакова, Е. А. Филиппова, М. Б. Албегова, А. С. Бавыкин, А. М. Савилова, С. И. Жданова

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

Обзор посвящен изучению этиологии, патогенеза, клинической картины и, прежде всего, современных методов лечения синдрома Криглера–Найяра (СКН) 1-го типа. Рассмотрены актуальные данные об эффективности и безопасности существующих терапевтических стратегий. Эффективная терапия данного заболевания основана на ранней диагностике и незамедлительном начале лечения, что критически важно для предотвращения инвалидирующих неврологических осложнений, связанных с билирубиновой энцефалопатией у пациентов с СКН 1-го типа. Ключевым методом лечения является продолжительная фототерапия, а радикальной мерой — трансплантация печени. Последние достижения в области генной терапии и использования мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток открывают новые возможности для разработки альтернативных, менее инвазивных методов лечения, направленных на улучшение качества жизни пациентов с этим заболеванием и снижение их зависимости от длительной фототерапии и послеоперационных рисков, связанных с трансплантацией печени.

Ключевые слова: синдром Криглера–Найяра 1-го типа, непрямая гипербилирубинемия, ядерная желтуха, фототерапия, трансплантация печени, генная терапия

Вклад авторов: А. В. Дегтярева, Д. Н. Дегтярев, Л. В. Ушакова, Е. А. Филиппова, М. Б. Албегова, А. С. Бавыкин, А. М. Савилова, С. И. Жданова — вклад в концепцию и структуру обзора, редактирование; М. С. Готьё — изучение литературы, написание обзора; Р. Р. Бородулина — изучение литературы, помощь в написании обзора.

✉ **Для корреспонденции:** Марина Сергеевна Готьё
ул. Академика Опарина, д. 4/Б, г. Москва, 117513, Россия; marina.gautier@gmail.com

Статья получена: 06.12.2024 **Статья принята к печати:** 20.12.2024 **Опубликована онлайн:** 30.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.070

APPROACHES TO THERAPY OF CRIGLER–NAJJAR SYNDROME TYPE 1 IN CHILDREN

Gautier MS ✉, Degtyareva AV, Degtyarev DN, Ushakova LV, Filippova EA, Albegova MB, Bavykin AS, Savilova AM, Zhdanova SI

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

The review is focused on exploring the etiology, pathogenesis, clinical manifestations, and primarily the contemporary treatment methods for Crigler–Najjar syndrome type 1. It considers relevant data regarding the efficacy and safety of the currently existing therapeutic strategies. Effective management of this condition relies on early diagnosis and prompt initiation of treatment, which are crucial for preventing disabling neurological complications associated with bilirubin encephalopathy in patients with Crigler–Najjar syndrome type 1. Prolonged phototherapy is the key treatment method, while liver transplantation represents a radical approach. Recent advances in gene therapy and the use of mesenchymal multipotent stromal cells present novel opportunities for developing alternative, less invasive treatment modalities aimed at improving the quality of life in such patients and reducing their dependence on long-term phototherapy, along with post-transplantation risk.

Keywords: Crigler–Najjar syndrome type 1, indirect hyperbilirubinemia, nuclear icterus, phototherapy, liver transplantation, gene therapy

Author contribution: Degtyareva AV, Degtyarev DN, Ushakova LV, Filippova EA, Albegova MB, Bavykin AS, Savilova AM, Zhdanova SI — contribution to the review concept and structure, editing; Gautier MS — literature search, writing the review; Borodulina RR — literature search, contribution to writing the review.

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina S. Gautier
Akademika Oparina, 4/B, Moscow, 117513, Russia; marina.gautier@gmail.com

Received: 06.12.2024 **Accepted:** 20.12.2024 **Published online:** 30.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.070

Синдром Криглера–Найяра представляет собой редкое наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, которое характеризуется нарушением конъюгации билирубина в печени в результате отсутствия или снижения активности фермента билирубуридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы (УДФ-ТФ), что приводит к развитию негемолитической желтухи.

Этиология

Ген *UGT1A1*, кодирующий фермент УДФ-ТФ, играет ключевую роль в конъюгации непрямого билирубина. Мутации в гене *UGT1A1* могут привести к полной утрате или снижению активности фермента, что вызывает гипербилирубинемия. В зависимости от степени снижения активности фермента, СКН классифицируют на I (СКН1) и II типы. При СКН1 отсутствует активность фермента, в связи с чем в отсутствие лечения заболевание приводит к тяжелым неврологическим нарушениям вследствие билирубиновой

энцефалопатии. СКН 2-го типа (СКН2) протекает с более низким уровнем билирубина в сыворотке крови и, как правило, не приводит к неврологическим нарушениям.

СКН1 чрезвычайно редко встречается. Частота встречаемости составляет около 0,6–1 случая на 1 млн живых новорожденных во всем мире и менее одного на каждые 100 000 новорожденных в Европе [1, 2]. Оба пола одинаково подвержены этому заболеванию, и отсутствуют различия в распространенности патологии во всех этнических группах. Тем не менее, оно чаще встречается в генетически изолированных популяциях, таких как общины старообрядцев и меннонитов, а также среди детей, рожденных от родителей в родственном браке [3, 4].

Фенотип СКН1 может быть вызван различными изменениями в кодирующих последовательностях гена билирубин-уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы (*UGT1A1*), которые приводят к образованию аномального белка, что ведет к полной потере или очень низкому уровню активности фермента. Это контрастирует с клинической

картиной при синдроме Жильбера, где дефект находится в промоторной области, а не в самом гене, в результате синтезируется меньшее количество нормального фермента [5]. Ген *UGT* экспрессируется во множестве изоформ, из которых *UGT1A1* является единственным, вносящим значительный вклад в конъюгацию билирубина у людей. Делеции, вставки, миссенс-мутации или преждевременные стоп-кодоны в гене *UGT1A1* могут располагаться в любом из пяти экзонов, составляющих мРНК *UGT1A1*. Генетические изменения, расположенные в экзоне 1, влияют на активность только изоформы билирубина-*UGT* (*UGT1A1*); напротив, мутации, затрагивающие экзоны 2–5, влияют на все изоформы, экспрессируемые из локуса *UGT1A* [6].

Клиническая картина

Проявлением синдрома СКН1 является желтуха, обусловленная повышением неконъюгированного билирубина. Обычно она появляется на 2–3 сутки жизни, когда уровень билирубина превышает 85 мкмоль/л. В дальнейшем уровень билирубина прогрессивно нарастает и достигает 340–500 мкмоль/л в первые 10 дней жизни, а в тяжелых случаях повышается до 850 мкмоль/л. Наиболее высокая вероятность развития билирубиновой энцефалопатии существует в раннем неонатальном периоде, что связано с высокой проницаемостью гематоэнцефалического барьера. Для оценки риска неврологических осложнений используют как общий сывороточный билирубин, так и соотношение билирубин/альбумин. Показатели уровня общего сывороточного билирубина более 510 мкмоль/л и соотношение билирубин/альбумин более 1,0 моль/моль считают абсолютными пороговыми нейротоксичности для детей старше 1 месяца жизни [3, 7]. В неонатальном периоде пороговый уровень билирубина зависит от совокупности признаков: гестационного и постнатального возраста и состояния ребенка. При отсутствии лечения СКН1 приводит к острой билирубиновой энцефалопатии, ядерной желтухе и стойким когнитивным расстройствам. Симптомы поражения ЦНС при СКН1 включают измененное сознание, изменения мышечного тонуса, нарушение слуха и др. Опубликован клинический случай поздней диагностики СКН1, с исходом в грубые неврологические нарушения в виде спастического тетрапареза [8]. В другом клиническом наблюдении у ребенка с СКН1 неврологические нарушения были выявлены в 4-месячном возрасте и выражались в задержке нервно-психического развития, фокальной структурной эпилепсии [9]. Ядерная желтуха является следствием отложения билирубина в клетках головного мозга, в основном в базальных ганглиях, бледном шаре, гиппокампе, субталамическом ядре, роге Аммона, ядрах черепных нервов и мозжечке. Хореоатетозидный церебральный паралич, высокочастотная центральная нейросенсорная тугоухость, паралич вертикального взгляда и гипоплазия зубной эмали — основные признаки ядерной желтухи [10]. Важно отметить, что билирубиновая энцефалопатия может возникнуть и в подростковом возрасте или у взрослых, что послужило поводом для внедрения более широкого термина — расстройство спектра билирубиновой энцефалопатии (*kernicterus spectrum disorder*), который объединяет диагнозы на основе клинических и патофизиологических критериев [4, 11, 12]. В литературе представлены результаты исследования 239 случаев СКН1, описывающего различные его исходы, в том числе высокий риск развития билирубиновой

энцефалопатии и других серьезных осложнений. Авторы отмечают, что у 45% пациентов развивается повреждение головного мозга, в 27% случаев требуется трансплантация печени, в 19% случаев проводились заменное переливание крови или плазмаферез [3].

Исторически СКН1 расценивали как непрямую гипербилирубинемия без поражения ткани печени. Однако недавние сообщения свидетельствуют о том, что фиброз печени присутствует у 40–60% пациентов, перенесших трансплантацию печени по поводу СКН1; степень фиброза коррелирует с концентрацией билирубина и возрастом. Гистологическое исследование биоптатов печени, эксплантированной во время трансплантации печени у 22 пациентов с СКН1, демонстрировало различную степень фиброза в 41% случаев, при этом клинических и лабораторных признаков цирроза печени и портальной гипертензии не было [13].

Качество жизни при СКН1 может быть существенно снижено как для самих пациентов, так и для лиц, осуществляющих уход. Для пациентов с СКН1 фототерапия требуется 10–12 ч в день с первых дней жизни [14]. И хотя фототерапия относится к неинвазивным и простым методам лечения, она значительно влияет на образ жизни семьи, накладывая социальные ограничения, тяжелое бремя на пациентов и ухаживающих за ними лиц [15]. Трансплантацию печени считают радикальным методом лечения, но она сопряжена с рисками, такими как подбор донора, потенциальное отторжение трансплантата и необходимость пожизненного приема иммунодепрессантов.

Отдельной проблемой является гипербилирубинемия во время беременности у женщин, страдающих СКН1. Существует риск развития ядерной желтухи у плода и повышения уровня материнского билирубина во время беременности. Неконъюгированный билирубин проходит через плаценту путем пассивной диффузии [15]. Рекомендуются регулярный мониторинг и корректировка продолжительности фототерапии для поддержания уровня материнского билирубина ниже 200 мкмоль/л с соотношением билирубин/альбумин не выше 0,5 моль/моль [16]. Описано успешное применение фототерапии в первом триместре и фенобарбитала в последующих триместрах для поддержания безопасного уровня билирубина у беременных женщин с СКН2 [17]. Есть опыт ведения новорожденных от женщин с СКН1, которые потребовали обменных переливаний крови после рождения; у одного из них в 7 месяцев была выявлена нейросенсорная тугоухость, несмотря на фототерапию и инфузию альбумина во время беременности у матери [18].

Диагностика

Ранняя диагностика СКН1 необходима для предотвращения инвалидизирующих неврологических осложнений вследствие билирубиновой энцефалопатии. Дифференциальный диагноз проводят с другими причинами неконъюгированной гипербилирубинемии, такими как желтуха, вызванная составом грудного молока, и полицитемия, системные заболевания и другие наследственные нарушения обмена билирубина. Ключевым различием СКН1 и СКН2 является степень повышения уровня билирубина, хотя в первые недели жизни цифры, вызывающие повреждение головного мозга, могут совпадать при этих двух состояниях. Возможно проведение пробы с фенобарбиталом: его назначение пациентам с СКН2 приводит к снижению

уровня билирубина в крови приблизительно на 25%, тогда как при СКН1 терапия фенобарбиталом неэффективна.

Подтверждающим методом диагностики для СКН является молекулярно-генетическое исследование с целью поиска патогенных вариантов в гене *UGT1A1*, кодирующем фермент, ответственный за конъюгацию билирубина. СКН1 может быть результатом различных генетических нарушений, включая миссенс- и нонсенс-мутации, вставки, делеции и нарушения сплайсинга, влияющие на любой из пяти экзонов кодирующей области *UGT1A1*. Поэтому важно секвенировать не только все экзоны, но и фланговые интроны, использовать таргетное секвенирование по Сенгеру или секвенирование нового поколения [19]. СКН1 связан с более тяжелыми мутациями, включая преждевременные стоп-кодоны, сдвиги рамки считывания или миссенс-мутации (замена одной аминокислоты), что приводит к полной утрате активности фермента УДФ-ТФ. Напротив, при СКН2, как правило, имеют место миссенс-мутации, которые уменьшают каталитическую активность фермента, но не устраняют ее полностью. Если у пациента с СКН2 имеется также промоторная мутация *UGT1A128* типа, характерная для синдрома Жильбера, гипербилирубинемия может быть еще более выраженной из-за снижения экспрессии фермента [15, 20, 21].

Лечение

В настоящее время используют различные подходы к терапии СКН1. Рассмотрим более детально наиболее изученные и часто используемые методы лечения.

Подходы к терапии неконъюгированной билирубинемии при СКН1 в неонатальном периоде, на этапе стационарного лечения, не отличаются от таковых при других причинах не прямой гипербилирубинемии, в соответствии с актуальными клиническими рекомендациями, фототерапия и/или заменное переливание крови проводится при достижении пороговых значений сывороточного уровня общего билирубина, являющихся показаниями к соответствующему методу лечения.

Фототерапия

Фототерапия (ФТ) является методом первого выбора в лечении СКН1, особенно в младенческом и детском возрасте, она существенно изменяет течение заболевания. ФТ работает путем преобразования билирубина IX-альфа-ZZ в его конфигурационные изомеры (например, люмирубин), которые затем могут экскретироваться с желчью без необходимости конъюгации [22]. И хотя ФТ использует в лечении не прямой гипербилирубинемии уже многие десятилетия, примечательно, что первые рекомендации, предлагающие принципы эффективной ФТ для пациентов с СКН, были опубликованы лишь в июне 2020 г.: какой источник света следует использовать, расстояние источника света от кожи, площадь обнаженной поверхности тела и продолжительность светового воздействия [3]. Лечение следует начинать как можно скорее после рождения при выявлении высоких значений сывороточного билирубина. При необходимости обменного переливания крови ФТ целесообразно начинать после проведения процедуры. Продолжительность ФТ в среднем должна составлять $12,4 \pm 0,8$ ч в сутки, включая ночные часы. Различные системы ФТ обеспечивают высокую интенсивность излучения на больших поверхностях тела, однако ее

эффективность снижается в пубертатном периоде из-за целого ряда факторов, таких как утолщение кожи, увеличение пигментации и уменьшения соотношения площади поверхности тела к массе тела. В то же время, у пациентов в подростковом возрасте существует высокий риск повышения уровня билирубина до критических значений, опасных с точки зрения развития неврологических нарушений. В этом возрасте требуется рассмотрение вопроса об альтернативных или вспомогательных методах лечения [3, 23].

Хотя ФТ эффективна для лечения гипербилирубинемии, она не лишена побочных эффектов. В одном из опубликованных обзоров затронуты вопросы использования ФТ для лечения гипербилирубинемии у новорожденных, ее эффективность и потенциальные риски, такие как влияние на иммунную систему, развитие опухолей, невусов и аллергических заболеваний [24]. Так, описано влияние ФТ на изменение уровня цитокинов в крови новорожденных. Есть данные, что на фоне 24 ч ФТ отмечается снижение уровня интерлейкина 6 (IL6) [25]. Другие исследования демонстрируют увеличение уровней IL2 и IL10 и уменьшение уровня IL1 β . Показано также воздействие ФТ на количество и активность лейкоцитов. Ряд исследований указывает на временное повышение уровня лейкоцитов, однако эти изменения обычно временны и не имеют клинического значения. Авторами представлены данные о том, что ФТ может влиять на уровень антител и иммуноглобулинов в организме новорожденного. Световые волны определенной длины могут вызывать структурные изменения в молекулах билирубина, превращая их в более растворимые формы, которые легче выводятся из организма. Это может косвенно влиять на метаболизм белков, включая антитела и иммуноглобулины. ФТ может также изменять клеточный метаболизм, что приводит к изменениям в пролиферации и дифференцировке клеток, включая те, которые участвуют в производстве антител и иммуноглобулинов [26, 27].

Существуют также данные о том, что ФТ может быть связана с повышенным риском развития опухолей у детей. Было проведено два крупных когортных исследования в Калифорнии, в которых обнаружили связь между использованием ФТ в младенчестве и развитием острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) у детей. Эти результаты показали, что риск развития ОМЛ у детей, проходивших фототерапию, был выше [28]. В других исследованиях не подтверждена связь ФТ с высоким риском онкологических заболеваний. Например, не выявлена связь между ФТ и развитием меланомы или других видов рака кожи. Также нет убедительных доказательств того, что ФТ повышает риск развития базальноклеточного или плоскоклеточного рака [29]. Таким образом, влияние ФТ на развитие опухолей остается спорным вопросом, требующим дальнейшего изучения.

Опубликованы работы, в которых было показано, что дети, получавшие ФТ в неонатальном периоде, могут иметь повышенный риск развития аллергии, включая бронхиальную астму и поллиноз [30, 31].

Отдельно стоит отметить высокий риск формирования желчных камней у пациентов с СКН. В литературе нет прямых указаний на связь ФТ и развитие желчекаменной болезни, однако можно предположить такую связь в связи с активной конъюгацией билирубина под воздействием ФТ, а также дегидратацией и, как следствие, высокой вероятностью сгущения желчи. В нормальном состоянии уровень уробилина в желчи очень низок, однако при

проведении ФТ в желчь выделяются водорастворимые изомеры уробилиногена, часть которых может преобразовываться обратно в уробилин, образующий кристаллы, способствующие образованию камней в желчном пузыре. По данным всемирного когортного исследования, частота желчнокаменной болезни среди пациентов с СКН составляет не менее 15% [2], другие авторы указывают более высокую распространенность — до 41% [3].

Генная терапия

При СКН генная терапия направлена на коррекцию функции мутантного гена путем достижения устойчивой экспрессии функциональной копии пораженного гена. На данный момент это возможно с использованием вирусных векторов. Наиболее успешны для внутриклеточной генной терапии векторы, созданные на основе аденоассоциированного вируса (AAV). AAV-опосредованная генная терапия продемонстрировала эффективность как в доклинических моделях, так и в клиническом применении для лечения гемофилии А и В с положительными результатами, что привело к недавнему одобрению FDA препарата валоктоген роксапаровек (*Valoctocogene hexarvovect*) для лечения гемофилии А [32]. В одной из работ было показано, что векторы на основе аденоассоциированного вируса эффективно трансдуцируют клетки печени как в культуре клеток, так и в моделях животных, включая мышей и крыс. Более того, было продемонстрировано, что введение этих векторов приводит к нормализации уровня билирубина в крови у животных с СКН. Проведены доклинические исследования безопасности и эффективности этих векторов, включая анализ иммунного ответа и биораспределения в различных тканях организма. Исследования биораспределения показали, что AAV-векторы преимущественно накапливаются в печени, селезенке и лимфатических узлах, что соответствует их тропизму к этим органам после внутривенного введения. Было также обнаружено низкоуровневое присутствие векторных частиц в гонадах спустя несколько месяцев после инъекции. Эти данные указывают на необходимость тщательного мониторинга потенциального риска передачи генов через репродуктивные клетки. Представленные данные подтверждают безопасность и эффективность использования AAV-векторов для терапии СКН и необходимость проведения клинических исследований [33]. Опубликованы данные об эффективности генной терапии у взрослых пациентов с СКН1. Они демонстрируют продолжительную коррекцию уровня билирубина до уровней, значительно ниже нейротоксичных, что позволяет пациентам сократить или даже отменить фототерапию. Представлены результаты оценки безопасности и эффективности однократной внутривенной инфузии аденоассоциированного вирусного вектора (AAV) у пяти взрослых пациентов с СКН1. У троих из них, получавших более высокую дозу, наблюдалось снижение уровня билирубина ниже 300 мкмоль/л (17,5 мг/дл), что позволило прекратить фототерапию на протяжении следующих 18 месяцев наблюдения. Однако полная нормализация уровня билирубина не была достигнута ни в одном случае в данном исследовании [34]. Хотя генная терапия представляется многообещающим терапевтическим методом для лечения СКН1, существуют сомнения относительно ее долгосрочной эффективности и безопасности. Действительно, продолжительность действия

однократного введения AAV-трансгенного вектора остается неопределенной [35]. Главное препятствие для эффективности векторного препарата — образование нейтрализующих антител против AAV, что ограничивает возможность дальнейшего введения векторов [36]. В ходе доклинических исследований на крысах и мышях было установлено, что все животные развивали значительный иммунный ответ против капсида AAV, помимо этого некоторые животные демонстрировали образование антител против белка UGT1A1. С целью определения источника этого иммунного ответа проводили эксперименты с использованием векторов, несущих транскрипты *UGT1A1* от разных видов (мышиный и крысиный варианты), и было показано, что антитела против человеческого варианта *UGT1A1* образуются реже при использовании видоспецифических вариантов. Возможно происходит снижение иммуногенности векторов путем использования видоспецифических транскриптов [33]. Помимо вышесказанного, множественные инфузии AAV-векторов создают потенциальную угрозу генотоксичности [37]. Исследование влияния антител к аденоассоциированному вектору (AAV) на эффективность генной терапии для лечения СКН1 показало, что около трети пациентов с СКН1 имеют эти антитела и что их низкий уровень может быть преодолен путем использования векторов AAV, содержащих как полные, так и пустые капсиды [38]. Вопрос иммуносупрессии с целью подавления гуморального иммунного ответа остается крайне актуальным при использовании векторных препаратов. В настоящее время нет общепринятого подхода к профилактике образования нейтрализующих антител к вводимому вектору. Один из подходов включает использование кортикостероидов, таких как преднизолон или метилпреднизолон, для подавления активности иммунной системы. Применяют и другие иммунодепрессанты, включая цитостатики, такие как азатиоприн, циклоспорин А, микофенолата мофетил и такролимус [34].

Генная терапия с использованием вектора AAV особенно перспективна для взрослых пациентов, но сталкивается с проблемами при лечении детей и подростков в связи с риском снижения эффективности терапии вследствие активной пролиферации гепатоцитов растущей печени [39]. В 2006 г. было проведено сравнение эффективности различных серовариантов AAV для создания вектора в испытаниях на крысах. Результаты показали, что векторы AAV наиболее эффективны в коррекции дефицита *UGT1A1 in vivo*. Однако были также обнаружены крупные жировые включения неопределенного происхождения в ткани печени у всех животных в испытании, что вызывает беспокойство по поводу возможных побочных эффектов [40].

Деонтологической проблемой применения генной терапии является риск появления у пациентов чрезмерных иллюзий по поводу эффективности консервативной терапии, что ведет к пренебрежению рядом других методов лечения, таких как фототерапия и трансплантация печени.

Трансплантация печени

Трансплантация печени (ТП) — единственный радикальный метод лечения СКН1 [41, 42]. В настоящее время нет обоснованных рекомендаций относительно не только показаний, но и сроков проведения ТП у пациентов с СКН1. До сих пор неясно, когда в ходе заболевания следует рассматривать возможность проведения

ТП и какие клинические и лабораторные показатели необходимо учитывать для направления пациентов с СКН1 на консультацию к трансплантологу [43] в условиях, когда функции печени сохранены и отсутствуют жизнеугрожающие состояния, являющиеся показанием к ТП. В то же время показанием может стать снижение качества жизни пациента в связи с необходимостью ежедневных циклов фототерапии, а также потеря эффективности ФТ с возрастом. С развитием генной терапии возникают новые вопросы о целесообразности проведения трансплантации печени (ТП). Перспектива излечения без хирургического вмешательства привлекает пациентов и их родителей, что ведет к длительному периоду наблюдения, во время которого могут иметь место эпизоды повышения уровня билирубина до нейротоксичных значений. Таким образом, определение оптимального времени для проведения ТП имеет решающее значение — слишком позднее выполнение может привести к необратимому повреждению вещества головного мозга, тогда как ТП в раннем возрасте увеличивает риск осложнений. Помимо этого, несомненно, ТП влечет за собой интраоперационные и послеоперационные риски и требует пожизненной иммуносупрессии. Описан опыт проведения ТП от живых родственных доноров четырем детям с СКН1 в возрасте 2, 8,5 и 15 месяцев и 13 лет. Все дети имели высокий уровень неконъюгированного билирубина на фоне постоянного применения ФТ. У одного пациента были неврологические нарушения вследствие билирубиновой энцефалопатии. После трансплантации у всех детей нормализовался уровень билирубина, но пациент с неврологическим дефицитом и спастическими нарушениями умер через 10 месяцев после операции вследствие хронического аспирационного синдрома. Авторы подчеркивают важность проведения трансплантации печени до развития неврологических нарушений [44]. Терапию (заменное переливание крови/плазмаферез/фототерапия) важно начать при первых признаках билирубиновой энцефалопатии и рассмотреть вопрос о ранних сроках ТП для предотвращения неврологических осложнений. Опубликованы и другие исследования, подчеркивающие необходимость ранней ТП. Так, был описан клинический случай ТП ребенку с СКН1 в возрасте 18 месяцев, когда повышение уровня билирубина привело к развитию ядерной желтухи, что проявилось неврологическими осложнениями в виде синдрома угнетения, повышения мышечного тонуса и впоследствии атетонидными двигательными нарушениями. Пациенту провели трансплантацию левой доли печени от трупного донора, после чего отмечался регресс неврологических нарушений [45]. Другими авторами описаны случаи проведения ТП троим пациентам с СКН1 в возрасте 7, 12 и 3 лет. У семилетнего ребенка отмечалась задержка психического развития. Двенадцатилетний ребенок имел более грубое поражение головного мозга, проявляющееся нарушениями координации движений, задержкой речевого, психического и физического развития вследствие билирубиновой энцефалопатии. Третий пациент 3 лет не имел каких-либо признаков неврологического дефицита. Все трое нуждались в интенсивной фототерапии. У всех троих отсутствовали осложнения, связанные с ТП, кроме того, после ТП у обоих пациентов с неврологическими нарушениями улучшились показатели психического и моторного развития. Эти результаты подтверждают мнение о том, что ранняя трансплантация печени может быть эффективным методом

лечения для предотвращения необратимых повреждений головного мозга у пациентов с данным заболеванием [46].

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

В последнее десятилетие активно изучается возможность использования стволовых клеток в лечении ряда метаболических нарушений, и в том числе, у пациентов с СКН1. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) также применяли в терапии СКН1. ММСК могут быть эффективно и безопасно получены из плодных оболочек или плацентарного остатка пуповины, высвобождающихся после естественных родов. Современный опыт использования ММСК в клинической практике подтверждает их безопасность и отсутствие необходимости в проведении иммуносупрессивной терапии. Показано, что при внутривенном введении эти клетки избирательно накапливаются в печени, могут дифференцироваться в гепатоциты и участвовать в регенерации печени [47]. Стволовые клетки, выведенные из костной и жировой тканей, способны восстанавливать функцию печени путем дифференциации в гепатоциты, а клетки, полученные из пуповинной крови, дифференцируются в клеточные структуры, подобные гепатоцитам, которые экспрессируют маркеры, специфичные для гепатоцитов, и сохраняют потенциал к гепатогенезу для клеточной терапии. Клетки, полученные из плаценты, также обладают большим потенциалом к мультилинейной дифференцировке [48–50]. Результаты введения ММСК, полученных из пуповинной крови человека, непосредственно в печень мышей показали высокий потенциал восстановления печеночной ткани и ее функций у мышей [51, 52]. Согласно этим данным, выделенные из пупочного канатика клетки, имеют характеристики, сходные с характеристиками стволовых клеток костного мозга. В модели повреждения печени у мышей после трансплантации ММСК клетки распределялись по всему организму реципиентных мышей через 7 дней после трансплантации. После трансплантации клетки обнаруживались в поврежденных тканях печени. Через 14 дней после трансплантации экспрессия генов, специфических для гепатоцитов, наблюдалась в печени мышей. Опыт применения ММСК был продемонстрирован другими авторами у ребенка с СКН1 [53]. В представленном наблюдении на фоне шести введений ММСК, в течение двух лет, отмечалось значительное снижение продолжительности ФТ до 2 ч в день. Положительный эффект развивался в течение 4–7 дней после введения и сохранялся в течение 2–3 месяцев. Во время и после трансплантации не было отмечено побочных эффектов или осложнений. Таким образом, внутривенная трансплантация ММСК является эффективной технологией лечения СКН1, уменьшающей потребность в проведении фототерапии, значительно улучшающей качество жизни пациентов и продлевающей жизнь пациентов с нативной печенью [53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СКН — тяжелое заболевание, способное привести к инвалидизирующим неврологическим последствиям и летальному исходу. До настоящего времени не разработано четкого протокола ведения пациентов с СКН1. Хотя ФТ является основным методом контроля уровня билирубина у детей с СКН1 с первых дней жизни,

потребность в постоянной ФТ существенно снижает качество жизни. Трансплантация печени как радикальный метод лечения СКН1 несет за собой послеоперационные риски и необходимость пожизненной иммуносупрессии, кроме того, до настоящего момента не определены оптимальные сроки проведения ТП у пациентов с этим

заболеванием. Продолжается исследование безопасности и эффективности генной терапии для пациентов с СКН. Хотя генная терапия остается многообещающим методом лечения этого заболевания, есть сомнения относительно ее долгосрочной эффективности и безопасности.

Литература

- Ebrahimi A, Rahim F. Crigler–Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18 (3): 201–11.
- Aronson SJ, et al. Disease burden and management of Crigler–Najjar syndrome: Report of a world registry. *Liver International*. 2022; 42 (7): 1593–604.
- Strauss KA, et al. Crigler–Najjar Syndrome Type 1: Pathophysiology, Natural History, and Therapeutic Frontier. *Hepatology*. 2020; 71 (6): 1923–39.
- Kovačić Perica M, et al. Case report: Crigler–Najjar syndrome type 1 in Croatia—more than a one in a million: a case series. *Front Pediatr*. 2023; 11.
- Ильченко Л. Ю. и др. Наследственная неконъюгированная гипербилирубинемия (сочетание синдрома Криглера–Найяра II типа и синдрома Жильбера). *Hepatology and Gastroenterology*. 2021; 5 (1): 79–84.
- Иванова А. А., Максимов В. Н. Молекулярно-генетические аспекты синдрома Жильбера, синдромов Криглера–Найяра I и II типов. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2023; 8: 56–62.
- Iskander I, et al. Serum Bilirubin and Bilirubin/Albumin Ratio as Predictors of Bilirubin Encephalopathy. *Pediatrics*. 2014; 134 (5): e1330–e1339.
- Ворончихина А. С., Спиваковский Ю. М. Клинический случай поздней диагностики синдрома Криглера–Найяра у ребенка 5 лет. 2024; с. 950–2.
- Каржавина Л. И., Ефишова С. Г., Тамахина Н. В. Клинический случай синдрома Криглера–Найяра 1-го типа у ребенка первого года жизни. 2022; с. 85–89.
- Дегтярева А. В. Синдром Криглера–Найяра. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 1999; 44 (4): 44–48.
- Shapiro SM, Riordan SM. Review of bilirubin neurotoxicity II: preventing and treating acute bilirubin encephalopathy and kernicterus spectrum disorders. *Pediatr Res*. 2020; 87 (2): 332–7.
- Shapiro S, et al. The Neurological Sequelae of Neonatal Hyperbilirubinemia: Definitions, Diagnosis and Treatment of the Kernicterus Spectrum Disorders (KSDs). *Curr Pediatr Rev*. 2017; 13.
- Mitchell E, et al. Hepatic Parenchymal Injury in Crigler–Najjar Type I. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018; 66 (4): 588–94.
- Bortolussi G, Muro AF. Advances in understanding disease mechanisms and potential treatments for Crigler–Najjar syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2018; 6 (7): 425–39.
- Dhawan A, et al. Disease burden of Crigler–Najjar syndrome: Systematic review and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020; 35 (4): 530–43.
- Wilson JHP, et al. Recommendations for Pregnancies in Patients with Crigler–Najjar Syndrome. 2012; с. 59–62.
- Bansal S, et al. Effects of high bilirubin level in pregnancy in Crigler–Najjar syndrome type 2: An extremely rare but important clinical entity to recognize. *Med J Armed Forces India*. 2023; 79 (5): 597–600.
- Hannam S, et al. Normal neurological outcome in two infants treated with exchange transfusions born to mothers with Crigler–Najjar Type 1 disorder. *Eur J Pediatr*. 2009; 168 (4): 427–9.
- Kadakol A, et al. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler–Najjar and Gilbert syndromes: Correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat*. 2000; 16 (4): 297–306.
- Ebrahimi A, Rahim F. Crigler–Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18 (3): 201–11.
- Canu G, et al. Gilbert and Crigler Najjar syndromes: An update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells Mol Dis*. 2013; 50 (4): 273–80.
- Tcaciuc E, Podorean M, Tcaciuc A. Management of Crigler–Najjar syndrome. *Med Pharm Rep*. 2021; 94 (1): S64–S67.
- Itoh S, Onishi S. Kinetic study of the photochemical changes of (ZZ) -bilirubin IX α bound to human serum albumin. Demonstration of (EZ) -bilirubin IX α as an intermediate in photochemical changes from (ZZ) -bilirubin IX α to (EZ) -cyclobilirubin IX α . *Biochemical Journal*. 1985; 226 (1): 251–8.
- Faulhaber FRS, Procianoy RS, Silveira RC. Side Effects of Phototherapy on Neonates. *American Journal of Perinatology*. 2019; 36 (3): 252–7.
- Zarkesh M, et al. The effect of neonatal phototherapy on serum level of interleukin-6 and white blood cells' count. *J Clin Neonatol*. 2016; 5 (3): 189.
- Sirota L, et al. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pediatr*. 1999; 158 (11): 910–3.
- Procianoy R, et al. The Influence of Phototherapy on Serum Cytokine Concentrations in Newborn Infants. *Am J Perinatol*. 2010; 27 (05): 375–9.
- Newman TB, et al. Retrospective Cohort Study of Phototherapy and Childhood Cancer in Northern California. *Pediatrics*. 2016; 137 (6).
- Berg P. Is Phototherapy in Neonates a Risk Factor for Malignant Melanoma Development? *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997; 151 (12): 1185.
- Tham EH, et al. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia and childhood eczema, rhinitis and wheeze. *Pediatr Neonatol*. 2019; 60 (1): 28–34.
- Kuzniewicz MW, et al. Hyperbilirubinemia, Phototherapy, and Childhood Asthma. *Pediatrics*. 2018; 142 (4).
- Fda. Package Insert — HEMGENIX.
- Collaud F, et al. Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of Crigler–Najjar Syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019; 12: 157–74.
- D'Antiga L, et al. Gene Therapy in Patients with the Crigler–Najjar Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2023; 389 (7): 620–31.
- Aronson SJ, Ronzitti G, Bosma PJ. What's next in gene therapy for Crigler–Najjar syndrome? *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2023; 23 (2): 119–21.
- George LA, et al. Long-Term Follow-Up of the First in Human Intravascular Delivery of AAV for Gene Transfer: AAV2-hFIX16 for Severe Hemophilia B. *Molecular Therapy*. 2020; 28 (9): 2073–82.
- Sabatino DE, et al. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Molecular Therapy*. 2022; 30 (8): 2646–63.
- Aronson SJ, et al. Prevalence and Relevance of Pre-Existing Anti-Adeno-Associated Virus Immunity in the Context of Gene Therapy for Crigler–Najjar Syndrome. *Hum Gene Ther*. 2019; 30 (10): 1297–305.
- Bortolussi G, Muro AF. Advances in understanding disease mechanisms and potential treatments for Crigler–Najjar syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2018; 6 (7): 425–39.
- Seppen J, et al. Adeno-associated Virus Vector Serotypes Mediate Sustained Correction of Bilirubin UDP Glucuronosyltransferase Deficiency in Rats. *Molecular Therapy*. 2006; 13 (6): 1085–92.

41. Bortolussi G, Muro AF. Advances in understanding disease mechanisms and potential treatments for Crigler–Najjar syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2018; 6 (7): 425–439.
42. Fagioli S, et al. Monogenic diseases that can be cured by liver transplantation. *J Hepatol*. 2013; 59 (3): 595–612.
43. Di Dato F, D'Uonno G, Iorio R. Crigler–Najjar syndrome: looking to the future does not make us forget the present. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2024; 19 (1).
44. Özçay F, et al. Living Related Liver Transplantation in Crigler–Najjar Syndrome Type 1. *Transplant Proc*. 2009; 41 (7): 2875–7.
45. Tu Z-H, et al. Liver transplantation in Crigler–Najjar syndrome type I disease. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2012; 11 (5): 545–8.
46. Schauer R, et al. Treatment of Crigler–Najjar type 1 disease: relevance of early liver transplantation. *J Pediatr Surg*. 2003; 38 (8): 1227–31.
47. Graffmann N, et al. Generation of a Crigler–Najjar Syndrome Type I patient-derived induced pluripotent stem cell line CNS705 (HHUUKDi005-A). *Stem Cell Res*. 2021; 51.
48. Martin–Rendon E, et al. 5–Azacytidine–treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang*. 2008; 95 (2): 137–48.
49. Fukuchi Y, et al. Human Placenta–Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *Stem Cells*. 2004; 22 (5): 649–58.
50. Kakinuma S, et al. Human Cord Blood Cells Transplanted Into Chronically Damaged Liver Exhibit Similar Characteristics to Functional Hepatocytes. *Transplant Proc*. 2007; 39 (1): 240–3.
51. Yan Y, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver International*. 2009; 29 (3): 356–65.
52. Campard D, et al. Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology*. 2008; 134 (3): 833–48.
53. Сухих Г. Т., et al. Терапевтический эффект мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из пуповины человека, у пациента с синдромом Криглера–Найяра I типа. *Российский Вестник перинатологии и педиатрии*. 2019; 64 (4): 26–34.

References

1. Ebrahimi A, Rahim F. Crigler–Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18 (3): 201–11.
2. Aronson SJ, et al. Disease burden and management of Crigler–Najjar syndrome: Report of a world registry. *Liver International*. 2022; 42 (7): 1593–604.
3. Strauss KA, et al. Crigler–Najjar Syndrome Type 1: Pathophysiology, Natural History, and Therapeutic Frontier. *Hepatology*. 2020; 71 (6): 1923–39.
4. Kovačić Perica M, et al. Case report: Crigler–Najjar syndrome type 1 in Croatia—more than a one in a million: a case series. *Front Pediatr*. 2023; 11.
5. Ilchenko Lyu, et al. Nasledstvennaja nekonjugirovannaja giperbilirubinemija (sochetanie sindroma Kriglera–Najjara II tipa i sindroma Zhil'bera). *Hepatology and Gastroenterology*. 2021; 5 (1): 79–84. Russian.
6. Ivanova AA, Maksimov VN. Molekuljarno-geneticheskie aspekty sindroma Zhil'bera, sindromov Kriglera–Najjara I i II tipov. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2023; 8: 56–62. Russian.
7. Iskander I, et al. Serum Bilirubin and Bilirubin/Albumin Ratio as Predictors of Bilirubin Encephalopathy. *Pediatrics*. 2014; 134 (5): e1330–e1339.
8. Voronchihina AS, Spivakovskij YuM. Klinicheskij sluchaj pozdnej diagnostiki sindroma Kriglera–Najjara u rebenka 5 let. 2024; s. 950–2. Russian.
9. Karzhavina LI, Efshova SG, Tamahina NV. Klinicheskij sluchaj sindroma Kriglera–Najjara 1-go tipa u rebenka pervogo goda zhizni. 2022; s. 85–89. Russian.
10. Degtyareva AV. Sindrom Kriglera–Najjara. *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 1999; 44 (4): 44–48. Russian.
11. Shapiro SM, Riordan SM. Review of bilirubin neurotoxicity II: preventing and treating acute bilirubin encephalopathy and kernicterus spectrum disorders. *Pediatr Res*. 2020; 87 (2): 332–7.
12. Shapiro S, et al. The Neurological Sequelae of Neonatal Hyperbilirubinemia: Definitions, Diagnosis and Treatment of the Kernicterus Spectrum Disorders (KSDs). *Curr Pediatr Rev*. 2017; 13.
13. Mitchell E, et al. Hepatic Parenchymal Injury in Crigler–Najjar Type I. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2018; 66 (4): 588–94.
14. Bortolussi G, Muro AF. Advances in understanding disease mechanisms and potential treatments for Crigler–Najjar syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2018; 6 (7): 425–39.
15. Dhawan A, et al. Disease burden of Crigler–Najjar syndrome: Systematic review and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020; 35 (4): 530–43.
16. Wilson JHP, et al. Recommendations for Pregnancies in Patients with Crigler–Najjar Syndrome. 2012; c. 59–62.
17. Bansal S, et al. Effects of high bilirubin level in pregnancy in Crigler–Najjar syndrome type 2: An extremely rare but important clinical entity to recognize. *Med J Armed Forces India*. 2023; 79 (5): 597–600.
18. Hannam S, et al. Normal neurological outcome in two infants treated with exchange transfusions born to mothers with Crigler–Najjar Type 1 disorder. *Eur J Pediatr*. 2009; 168 (4): 427–9.
19. Kadakol A, et al. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler–Najjar and Gilbert syndromes: Correlation of genotype to phenotype. *Hum Mutat*. 2000; 16 (4): 297–306.
20. Ebrahimi A, Rahim F. Crigler–Najjar Syndrome: Current Perspectives and the Application of Clinical Genetics. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018; 18 (3): 201–11.
21. Canu G, et al. Gilbert and Crigler–Najjar syndromes: An update of the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene mutation database. *Blood Cells Mol Dis*. 2013; 50 (4): 273–80.
22. Tcaciuc E, Podurean M, Tcaciuc A. Management of Crigler–Najjar syndrome. *Med Pharm Rep*. 2021; 94 (1): S64–S67.
23. Itoh S, Onishi S. Kinetic study of the photochemical changes of (ZZ)-bilirubin IX α bound to human serum albumin. Demonstration of (EZ)-bilirubin IX α as an intermediate in photochemical changes from (ZZ)-bilirubin IX α to (EZ)-cyclobilirubin IX α . *Biochemical Journal*. 1985; 226 (1): 251–8.
24. Faulhaber FRS, Procianny RS, Silveira RC. Side Effects of Phototherapy on Neonates. *American Journal of Perinatology*. 2019; 36 (3): 252–7.
25. Zarkesh M, et al. The effect of neonatal phototherapy on serum level of interleukin-6 and white blood cells' count. *J Clin Neonatol*. 2016; 5 (3): 189.
26. Sirota L, et al. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia affects cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Pediatr*. 1999; 158 (11): 910–3.
27. Procianny R, et al. The Influence of Phototherapy on Serum Cytokine Concentrations in Newborn Infants. *Am J Perinatol*. 2010; 27 (05): 375–9.
28. Newman TB, et al. Retrospective Cohort Study of Phototherapy and Childhood Cancer in Northern California. *Pediatrics*. 2016; 137 (6).
29. Berg P. Is Phototherapy in Neonates a Risk Factor for Malignant Melanoma Development? *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1997; 151 (12): 1185.
30. Tham EH, et al. Phototherapy for neonatal hyperbilirubinemia and childhood eczema, rhinitis and wheeze. *Pediatr Neonatol*. 2019; 60 (1): 28–34.
31. Kuzniewicz MW, et al. Hyperbilirubinemia, Phototherapy, and Childhood Asthma. *Pediatrics*. 2018; 142 (4).
32. Fda. Package Insert — HEMGENIX.
33. Collaud F, et al. Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of Crigler–Najjar Syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019; 12: 157–74.

34. D'Antiga L, et al. Gene Therapy in Patients with the Crigler–Najjar Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2023; 389 (7): 620–31.
35. Aronson SJ, Ronzitti G, Bosma PJ. What's next in gene therapy for Crigler–Najjar syndrome? *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2023; 23 (2): 119–21.
36. George LA, et al. Long-Term Follow-Up of the First in Human Intravascular Delivery of AAV for Gene Transfer: AAV2-hFIX16 for Severe Hemophilia B. *Molecular Therapy*. 2020; 28 (9): 2073–82.
37. Sabatino DE, et al. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Molecular Therapy*. 2022; 30 (8): 2646–63.
38. Aronson SJ, et al. Prevalence and Relevance of Pre-Existing Anti-Adeno-Associated Virus Immunity in the Context of Gene Therapy for Crigler–Najjar Syndrome. *Hum Gene Ther*. 2019; 30 (10): 1297–305.
39. Bortolussi G, Muro AF. Advances in understanding disease mechanisms and potential treatments for Crigler–Najjar syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2018; 6 (7): 425–39.
40. Seppen J, et al. Adeno-associated Virus Vector Serotypes Mediate Sustained Correction of Bilirubin UDP Glucuronosyltransferase Deficiency in Rats. *Molecular Therapy*. 2006; 13 (6): 1085–92.
41. Bortolussi G, Muro AF. Advances in understanding disease mechanisms and potential treatments for Crigler–Najjar syndrome. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2018; 6 (7): 425–439.
42. Fagioli S, et al. Monogenic diseases that can be cured by liver transplantation. *J Hepatol*. 2013; 59 (3): 595–612.
43. Di Dato F, D'Uonno G, Iorio R. Crigler–Najjar syndrome: looking to the future does not make us forget the present. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2024; 19 (1).
44. Özçay F, et al. Living Related Liver Transplantation in Crigler–Najjar Syndrome Type 1. *Transplant Proc*. 2009; 41 (7): 2875–7.
45. Tu Z-H, et al. Liver transplantation in Crigler–Najjar syndrome type I disease. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 2012; 11 (5): 545–8.
46. Schauer R, et al. Treatment of Crigler–Najjar type 1 disease: relevance of early liver transplantation. *J Pediatr Surg*. 2003; 38 (8): 1227–31.
47. Graffmann N, et al. Generation of a Crigler–Najjar Syndrome Type I patient-derived induced pluripotent stem cell line CNS705 (HHUUKDi005-A). *Stem Cell Res*. 2021; 51.
48. Martin–Rendon E, et al. 5–Azacytidine–treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang*. 2008; 95 (2): 137–48.
49. Fukuchi Y, et al. Human Placenta–Derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. *Stem Cells*. 2004; 22 (5): 649–58.
50. Kakinuma S, et al. Human Cord Blood Cells Transplanted Into Chronically Damaged Liver Exhibit Similar Characteristics to Functional Hepatocytes. *Transplant Proc*. 2007; 39 (1): 240–3.
51. Yan Y, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver International*. 2009; 29 (3): 356–65.
52. Campard D, et al. Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. *Gastroenterology*. 2008; 134 (3): 833–48.
53. Suhij GT, et al. Terapevticheskij jeffekt mul'tipotentnyh mezenhimal'nyh stromal'nyh kletok, poluchennyh iz pupoviny cheloveka, u pacienta s sindromom Kriglera–Najjara I tipa. *Rossijskij Vestnik perinatologii i pediatrii*. 2019; 64 (4): 26–34. Russian.

ПОВЫШЕННАЯ ФИЗИЧЕСКАЯ НАГРУЗКА В УСЛОВИЯХ НОРМОКСИИ ВЫЗЫВАЕТ ИДИОПАТИЧЕСКУЮ КАХЕКСИЮ У *HETEROCEPHALUS GLABER*М. А. Адрианов¹✉, М. Ю. Бобров², И. З. Мамедов³, В. Н. Манских¹, А. А. Рачкова^{1,4}, А. М. Шелехова¹, Ч. М. Эльдаров^{1,4}, О. А. Аверина¹, М. Ю. Высоких^{1,4}¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия² Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия³ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия⁴ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Обогащение среды обитания живущих в неволе грызунов *Heterocephalus glaber* (голых землекопов), позволившее им реализовать врожденный поведенческий паттерн рытья плотного грунта, неизвестным образом привело к появлению в колонии необычных животных с признаками кахексии, отличавшихся от остальных животных сниженным индексом массы тела на фоне уменьшения доли подкожного жира. Сами животные демонстрировали при этом агрессивное пищевое поведение, но не набирали веса даже после прекращения рытья при отсоединении камеры с грунтом. Целью работы было выяснить патогенетический механизм наблюдаемого явления. Для этого из колонии изъяли животных с признаками кахексии (одна самка и два самца возрастом 4–5 лет), а также животных, не имеющих данных признаков (две самки и один самец возрастом 4–5 лет) в качестве контрольных. При гистологическом анализе тканей были выявлены гипертрофия сердца и гиперлипоз печени. На гипертрофию сердца также указывали результаты биоинформатического анализа секвенирования микроРНК сердца животных, который показал повышенный уровень микроРНК, ответственных за повышение активности деления клеток, и снижение активности апоптоза в сердце. Эти данные свидетельствуют о том, что животные, находясь в среде обитания с повышенным для них содержанием кислорода (21% против 8% в естественной среде обитания под землей), при выполнении физических нагрузок испытывали сильный окислительный стресс, что привело к нарушению работы регуляторных систем организма, подъему метаболизма в покое, перегрузке работы сердечно-сосудистой системы и повреждению органов и тканей. Таким образом, голые землекопы могут вести нормальную для них физическую активность только в условиях низкого содержания кислорода.

Ключевые слова: голый землекоп, кахексия, физическая нагрузка, окислительный стресс, липоз печени, метаболизм в состоянии покоя, гипероксия**Финансирование:** работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-14-00160 «Сравнительный анализ возрастных сигнатур у долго- и короткоживущих представителей *Heterocephalus glaber*: каст-специфичность поведенческих, биохимических и транскриптомных профилей».**Вклад авторов:** М. А. Адрианов — автор рукописи, проведение экспериментов с животными; М. Ю. Бобров, И. З. Мамедов — анализ биоинформатических данных, секвенирование микроРНК; В. Н. Манских — гистологическое исследование тканей; А. А. Рачкова — автор рукописи, анализ биоинформатических данных, пробоподготовка и выделение РНК; А. М. Шелехова, О. А. Аверина — проведение экспериментов с животными; Ч. М. Эльдаров — анализ биоинформатических данных; М. Ю. Высоких — дизайн эксперимента, создание концепции, написание рукописи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИИ ФХБ имени А. Н. Белозерского МГУ (протокол № 2/20 от 16 ноября 2022 г.).✉ **Для корреспонденции:** Михаил Андреевич Адрианов
Ленинские горы, д. 1, стр. 40, 119992, Москва, Россия; ya.litsch@gmail.com**Статья получена:** 11.12.2024 **Статья принята к печати:** 24.12.2024 **Опубликована онлайн:** 30.12.2024**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.071INCREASED PHYSICAL ACTIVITY UNDER CONDITIONS OF NORMOXIA CAUSES IDIOPATHIC CACHEXIA IN *HETEROCEPHALUS GLABER*Adrianov MA¹✉, Bobrov M², Mamedov I³, Manskih V¹, Rachkova AA^{1,4}, Shelekhova AM¹, Eldarov CM^{1,4}, Averina OA¹, Vysokikh MYu^{1,4}¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia² Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia⁴ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Enrichment of habitat of the captive rodents *Heterocephalus glaber* (naked mole rats) allowing them to implement the innate behavioral pattern of digging through hard soil somehow led to the emergence of unusual animals showing signs of cachexia in the colony; these differed from other animals by the reduced body mass index associated with subcutaneous fat reduction. Furthermore, the animals itself showed aggressive eating behavior, but showed no weight gain even after stopping digging due to detachment of the camera with soil. The study aimed to clarify the pathogenetic mechanism underlying the reported phenomenon. For that animals showing signs of cachexia (one female and two males aged 4–5 years) were withdrawn from the colony, along with the animals showing no such signs (two females and one male aged 4–5 years) as controls. Histologic assessment of tissues revealed cardiac hypertrophy and hyperlipofuscinosis of the liver. Cardiac hypertrophy was also suggested by the results of the animal heart microRNA sequencing bioinformatics analysis that revealed elevated levels of microRNA responsible for the increased cell division activity and reduced apoptotic activity in the heart. These data suggest that the animals living in the habitat with the increased oxygen content (21% vs. 8% in the natural habitat, underground) experienced severe oxidative stress during physical activity, which resulted in dysfunction of body's regulatory systems, increased metabolism at rest, cardiovascular system overload, and damage to organs and tissues. Thus, naked mole rats can have normal physical activity only under conditions of low oxygen content.

Keywords: naked mole rat, cachexia, physical burden, oxidative stress, lipofuscinosis, basal metabolic rate, hyperoxia**Funding:** the study was supported by the RSF grant No. 22-14-00160 "Comparative analysis of age signatures in long- and short-lived representatives of *Heterocephalus glaber*: caste-specificity of behavioral, biochemical and transcriptomic profiles".**Author contribution:** Adrianov MA — manuscript authoring, conducting animal experiments; Bobrov M, Mamedov I — bioinformatics data analysis, microRNA sequencing; Manskih V — histologic assessment of tissues; Rachkova AA — manuscript authoring, bioinformatics data analysis, sample preparation and RNA extraction; Shelekhova AM, Averina OA — conducting animal experiments; Eldarov CM — bioinformatics data analysis; Vysokikh MYu — experimental design, development of the concept, manuscript writing.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University (protocol No. 2/20 dated 16 November 2022).✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail A. Adrianov
Leninskie Gory, 1, bld. 40, 119992, Moscow, Russia; ya.litsch@gmail.com**Received:** 11.12.2024 **Accepted:** 24.12.2024 **Published online:** 30.12.2024**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.071

Голые землекопы (*Heterocephalus glaber*) — подземные грызуны, проживающие на территории Африканского Рога (Сомали, Эфиопия) — очень интересны для изучения. Одна из их отличительных особенностей — эусоциальность, а другая — аномально высокая продолжительность жизни. Так, при относительно малом весе (30–80 г) голые землекопы могут прожить до 37 лет в лабораторных условиях [1], в то время как грызун с тем же весом, например, домовая мышь *Mus musculus*, доживает в лабораторных условиях до 3 лет, а в природе — до 1,5 лет [2].

Создание условий содержания лабораторных животных, схожих с теми, которые присутствуют в их естественном ареале, — необходимая часть исследований, использующих их в изучении разных биологических процессов. При работе с голыми землекопами необходимо поддерживать высокую температуру и влажность, однако наиболее трудоемким процессом в их содержании является создание имитации подземного лабиринта, в котором будут обитать голые землекопы, находясь в лаборатории [3]. Сам лабиринт состоит из цилиндров и соединяющих их тоннелей, выполненных из акрилового стекла. Такая система содержания, однако, не дает возможности животным проявлять полностью всю свою физическую активность, так как цилиндры полностью не заполнены субстратом, который они могли бы копать. Известно, что из-за низкой физической активности иногда изменяется структура скелетных мышц, что может привести к неправильной интерпретации результатов исследований при сравнении с другими модельными объектами [4]. В связи с этим в лаборатории было принято решение для обогащения среды обитания голых землекопов установить дополнительный отсек, наполненный глиной, близкой по плотности к грунту Африканского рога.

Голые землекопы почти сразу начали копать туннели в грунте, что мы посчитали нормальной реакцией животных. Однако через полгода мы начали замечать внешние изменения некоторых особей. Они начали худеть, черты их морды обострялись, что напоминало состояние других животных, страдающих кахексией [5]. Мы считали, что причина тому — истощение их подкожной жировой клетчатки, при этом стоит отметить, что данные животные приходили самыми первыми к пище, которую они не перемещали в гнездо, что должны были сделать, будучи рабочими особями, а сразу на месте съедали, что указывало на их большую потребность в пище. Было принято решение убрать отсек с глиной и следить за их индексом массы тела в течение трех лет, с последующим изучением микроРНК в органах, которые могли пострадать: сердце, почки, печень, скелетная мышца. Кроме того, для выяснения причин такого аномального состояния животных были приготовлены гистологические препараты исследуемых тканей и органов.

Решение об изучении микроРНК было вызвано тем, что голые землекопы на данный момент мало изучены в области транскриптома, а микроРНК является эволюционно высококонсервативной структурой, которая участвует в регуляции экспрессии схожих генов у разных видов [6]. Целью данной работы было установление причин такого состояния животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Содержание и уход за животными

Колония голых землекопов ($n = 11$), полученная из Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research (IZW) (Берлин, Германия),

была размножена в НИИ Физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ до начала исследования до 54 особей. Каждое животное имеет индивидуальный RFID-чип, введенный под кожу, для их идентификации в колонии. Колонию содержали в пластиковых контейнерах цилиндрической формы, соединенных между собой пластиковыми трубами, при температуре 27 ± 1 °C и влажности $50 \pm 10\%$ с режимом дня и ночи 12 : 12 ч (10:00–22:00 — день). Питание состояло из яблок, батата, моркови, злаковых, которые предоставлялись ежедневно. Питьевой режим для животных не требуется, так как из-за их физиологии они могут получать воду только из твердого корма. Для обогащения среды проживания голых землекопов в колонии был установлен прямоугольный контейнер с глиной высокой плотности, имитирующей почву, характерную для естественной среды обитания животных. Контейнер был сразу убран после появления у 9 (3 самки и 6 самцов возрастом 2–6 лет) из 54 особей признаков кахексии. Для контроля состояния этих животных каждые 4–5 месяцев проводился мониторинг их индекса массы тела с контрольными животными схожего возраста ($n = 9$; 4 самки и 5 самцов). Эвтаназию животным проводили методом декапитации после введения в наркоз с помощью ингаляции изофлурана (Laboratorios Karizoo. S.A., Испания) 5% в потоке 0,4 л/мин в установке R500 (RWD, Китай).

Опытные группы животных для гистологического исследования и секвенирования микроРНК

Для исследования были отобраны две группы голых землекопов: здоровые животные ($n = 3$, одна самка и два самца) с температурой тела 30 °C, индексом массы тела 0,33 и животные с астеническим телосложением ($n = 3$, две самки и один самец) с температурой тела 27 °C, индексом массы тела 0,25.

Расчет индекса массы тела животных

Индекс массы тела (ИМТ, г/см²) рассчитывали по следующей формуле: ИМТ = масса животного, г / (длина животного, см)².

Гистологический анализ

Образцы печени животных фиксировали 10%-м формалином на 0,1M фосфатном буфере (pH = 7,4). Дегидратировали в пяти порциях изопропилового спирта («Биовитрум», Россия) по 2 ч в каждой. Пропитывали в двух порциях парафиновой среды Гистомикс («Биовитрум», Россия) по 2 ч в каждой и заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 3 мкм готовили на ротационном микротоме (Leica, Германия) и окрашивали гематоксилином Караци и эозином по рутинному протоколу. Препараты изучали с помощью микроскопа AxioScore A1 (Karl Zeiss, Германия). Фотографирование осуществляли цифровой камерой MRc.5 (Karl Zeiss, Германия).

Выделение и секвенирование микроРНК

После эвтаназии у каждого животного были взяты образцы печени, почки, сердца, скелетной мышцы. Из образцов тканей с использованием коммерческих наборов miRNEasy (Qiagen, США) были выделены фракции РНК, содержащие микроРНК. Полученные образцы использовали далее для создания библиотек кДНК и

последующего секвенирования. Качество выделенных фракций оценивали при помощи микроэлектрофореза на чипах Bioanalyzer (Agilent, США). Для секвенирования были отобраны образцы, имеющие индекс целостности РНК RIN (RNA integrity number) не меньше 8.

Секвенирование проводили на платформе NextSeq (Illumina, США) с использованием реагентов и расходных материалов NextSeq 500/550 High Output v2 kit (Illumina, США). Библиотеки кДНК из выделенных образцов РНК готовили с использованием наборов NEBnext (NEB, США), по методикам, рекомендованным производителем. Качественный и количественный анализ библиотек проводили при помощи микроэлектрофореза Bioanalyzer (Agilent, США) и флуориметрии на Qubit (ThermoFisher, США). Качество секвенирования оценивали при помощи сервиса BaseSpace (Illumina, США) по следующим параметрам: плотность кластеров, интенсивность сигнала в каналах детекции, доля кластеров, прошедших фильтр, по выходу выровненных прочтений. Все параметры не выходили за пределы допустимых значений.

Биоинформатический анализ данных секвенирования микроРНК

Полученные в результате секвенирования последовательности нуклеотидов (риды) проходили обязательную оценку качества с помощью программы fastqc, для дальнейшего исследования были отфильтрованы риды высокого качества (>30). Адаптеры были удалены с помощью программы cutadapt. После удаления адаптеров для дальнейшего исследования были выбраны только последовательности длиной 18–31 нуклеотид, соответствующие малым РНК.

Поиск микроРНК был произведен с помощью алгоритма miRDeep2 на основе генома голубого землекопа и с помощью информации о родственном геноме (*Mus musculus*). Далее из общего списка последовательностей были удалены случайные-и/или неспецифические последовательности. Для дальнейшего изучения отбирали только последовательности, которые присутствовали в более чем 60% образцов своей подгруппы (опытная или

контрольная группа соответствующей ткани или органа) и проходили при этом все фильтры по качеству.

Аннотация и анализ микроРНК

Для прошедших все фильтры микроРНК был проведен поиск человеческих ортологов с помощью программы blastn, в качестве базы данных для сравнения использовали базу микроРНК человека Mirbase v.22 (<https://mirbase.org/>).

Для поиска возможных мишеней микроРНК использовали базу данных микроРНК-таргетных взаимодействий Mirtarbase v 9.0 (<https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase>) и miRDB (<https://mirdb.org/mirdb>). Из базы данных Mirtarbase отбирали только те взаимодействия, что были подтверждены так называемыми «сильными» доказательствами — с помощью количественного ПЦР, блоттинга или использования репортерного гена. Из базы данных miRDB отбирали только мишени микроРНК с target score больше 80.

Для отобранных таким методом взаимодействий пар микроРНК–мишень было проведено обогащение по различным базам данных, таким как GO, KEGG, Reactome, Wikipathways с помощью платформы STRING (<https://string-db.org/>) для выявления наиболее вовлеченных метаболических путей и процессов.

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали в ПО IBM® SPSS® 24 (IBM, США) с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Внешний вид животных

В конце исследования у животных с признаками кахексии статистически значимо снизился ИМТ на 15% в сравнении с контрольными животными из этой же колонии (рис. 1). Внешний вид животных, страдающих кахексией, очень сильно отличался от внешнего вида контрольных животных. У них были впалые бока, обострившиеся черты морды (рис. 2).

Динамика ИМТ животных

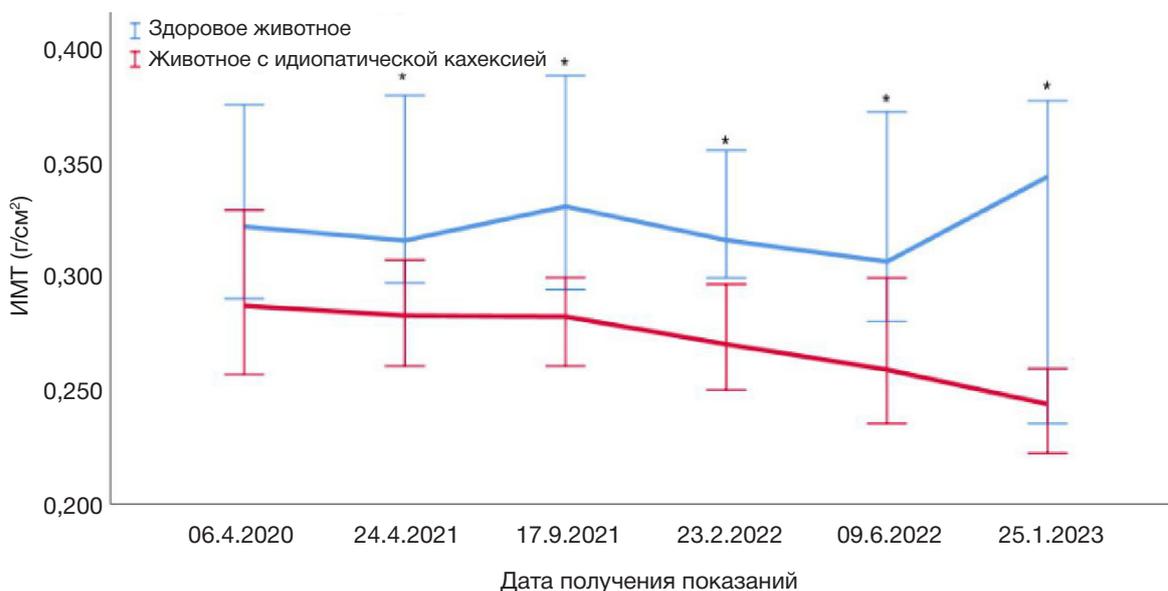


Рис. 1. График динамики ИМТ животных. Данные указаны в виде медианы с 95%-м доверительным интервалом. * — $p < 0,05$



Рис. 2. А. Внешний вид здорового животного. Б. Внешний вид животного с идиопатической кахексией

Гистологическое исследование печени

При извлечении печени после эвтаназии животных, страдающих кахексией, печень имела глубокий бурый цвет, в отличие от контрольных животных (рис. 3). При гистологическом исследовании печени был выявлен комплекс своеобразных и ранее не описанных у землекопа изменений. У всех особей со спонтанной идиопатической кахексией наблюдалось накопление в гепатоцитах большого количества светло-коричневого пигмента — липофусцина. У некоторых животных этот пигмент распределялся более или менее равномерно среди гепатоцитов печеночной дольки. У других наблюдалось накопление его преимущественно в периферических зонах с развитием резко выраженной жировой дистрофии гепатоцитов. При этом в перипортальных областях обнаружена гипертрофия клеток печени с резким увеличением размеров клеток и ядер и появлением в цитоплазме множества крупных эозинофильных гранул (митохондрий). У отдельных особей наблюдали явления экстремедулярного гематопоэза и эритрофагоцитоза гепатоцитами. У здоровых животных липофусцин и дистрофические изменения в гепатоцитах отсутствовали (рис. 4).

Как известно, липофусцин образуется из остатков мембран внутриклеточных органелл после их деградации в аутофагосомах. Поэтому накопление липофусцина в гепатоцитах является морфологическим проявлением интенсификации процесса аутофагии и «старения» клеток печени.

Аннотация микроРНК голого землекопа

После фильтрации полученных в результате секвенирования последовательностей по их длине и качеству были получены последовательности микроРНК из печени, почки, сердца и скелетной мышцы голого землекопа. Общий пул всех выявленных последовательностей был аннотирован по аналогии с человеческими ортологами в базе данных Mirbase. Впервые была создана база микроРНК голого землекопа



Рис. 3. Внешний вид печени животного с идиопатической кахексией

(приложение 1). Описаны 162 новых последовательности, на 90–100% идентичные человеческим аналогам. Более того, для 22 последовательностей малых РНК голого землекопа не было выявлено аналогов у человека. Исходя из этого, логично предположить, что для землекопа характерна дополнительная специфическая регуляция экспрессии генов. Ее адаптивное значение может быть выяснено в дальнейшем путем изучения спектра микроРНК генетически и экологически близких к голому землекопу кахексию голого землекопа (*Mus Musculus*, *Cavia porcellus*, *Ellobius talpinus*, *Cryptomys damarensis*).

Для выявленных в печени, почке, сердце и скелетной мышце микроРНК были проанализированы их потенциальные мишени и проведено обогащение по базам данных GO, KEGG, Reactome, Wikipathways (приложение 2–5). Анализ сигнальных путей и процессов, связанных с выявленными микроРНК и их генами-мишенями, показал, что существует множество разнонаправленных и определяющих большое количество клеточных и даже надклеточных функций, которые вовлекаются в нормальную физиологию и спонтанную идиопатическую кахексию голого землекопа. В частности, затрагиваются такие дистанцированные друг от друга процессы, как образование анатомических структур в процессе развития (Anatomical structure development) и связывание двухцепочечной ДНК (Double-stranded DNA binding). Особенно стоит отметить наличие микроРНК в сердце голых землекопов, которые ответственны за регуляцию экспрессии генов, подавляющих апоптоз, но индуцирующих деление клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Внешний вид и изменение ИМТ животных, страдающих кахексией, свидетельствует о том, что данные животные по неопределенной причине не могли набрать вес, хотя они при этом демонстрировали то же самое пищевое поведение, что и другие представители колонии, даже проявляя себя более агрессивно по отношению к еде, так как, будучи рабочими особями, не несли ее в гнездовой отсек, а сразу съедали в кормовом.

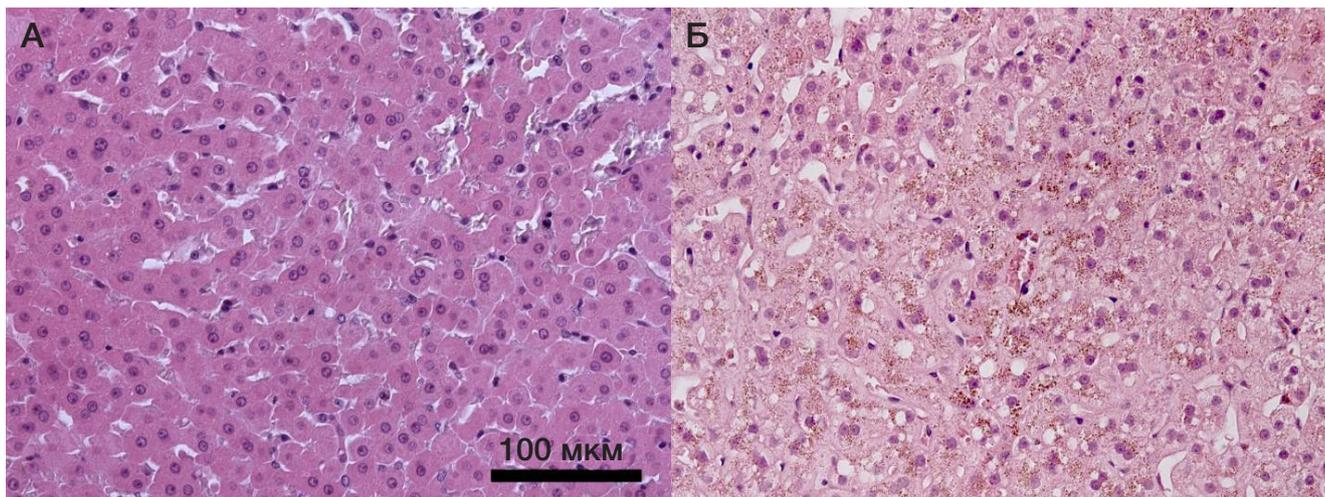


Рис. 4. А. Печень здорового животного. **Б.** Печень животного со спонтанной идиопатической кахексией. Коричневые включения в цитоплазме гепатоцитов — депозиты липофусцина. Окраска Н&Е, увеличение $\times 400$

Возможно, это связано с тем, что у данных животных затраты энергии в покое были намного выше, чем у контрольных животных, например, как при индукции гипертиреоза у крыс [7]. Это соответствует данным, полученным из результатов секвенирования микроРНК. У животных, страдающих кахексией, повышена доля микроРНК, ответственных за повышение активности деления клеток и снижение активности программируемой клеточной гибели и апоптоза в сердце, что указывает на повышение пролиферации клеток в миокарде с последующей его гипертрофией и также ассоциируется с индуцируемым гипертиреозом у мышей [8]. Данная гипертрофия необходима для повышения сердечного выброса и при повышении частоты сердечных сокращений приведет к повышению скорости метаболизма, что вероятно демонстрировали животные при невозможности набрать вес при прежнем питании. Эти изменения в сердце могут привести к его недостаточности, наблюдаемой у людей, также страдающих гипертиреозом, что приведет к меньшей продолжительности жизни страдающих кахексией животных по сравнению с их здоровыми собратьями [9].

Данное кахексичное состояние животных было также отражено на печени животных. Сама печень была ярко бурого, почти черного цвета. Это можно связать с большими отложениями липофусцина в ее ткани, что было продемонстрировано при гистологическом исследовании. Возможно, в ткани печени активно происходили процессы ремоделинга митохондрий, в котором активно участвуют процессы аутофагии, что было вызвано активным окислительным стрессом [10], так как данные животные в естественной среде обитания существуют при низком процентном содержании кислорода (8–15%) [11], а в лабораторных условиях содержатся при 21%,

т. е. в гипероксичной для них среде. У животных, страдающих кахексией, отягчающим фактором является их повышенный уровень метаболизма в состоянии покоя на фоне гиперактивации сердечно-сосудистой системы, которая за собой влечет активную работу дыхательной системы, что еще сильнее нагружает организм голого землекопа, страдающего кахексией, излишним уровнем кислорода в крови, который и мог вызвать данные проявления в печени [12] и сердце.

Выводы

Принимая в рассмотрение изложенные факты, можно предположить, что данное состояние голых землекопов было вызвано усилением физической нагрузки в состоянии гипероксии, что могло привести к поражению печени из-за хронического окислительного стресса, вследствие чего у данных особей уменьшилась продолжительность жизни и развилось патологическое состояние. Такой эффект показывает возможную уязвимость голых землекопов к повышенному содержанию кислорода в окружающем воздухе, что подтверждает их физиологическую предрасположенность к жизни именно при низком содержании кислорода. Однако остается неясной причина повышения уровня метаболизма в покое у животных даже в тот момент, когда провоцирующий фактор был убран. Возможно, это связано с необратимыми последствиями долговременного окислительного стресса на организм, из-за которого была нарушена регуляция клеток и интегративных систем. Чтобы выяснить это, необходимо провести дальнейшие исследования данных животных, в частности провести транскриптомный анализ и изучить экспрессию мишеней дифференциально экспрессированных микроРНК.

Литература

1. Lee BP, Smith M, Buffenstein R, Harries LW. Negligible senescence in naked mole rats may be a consequence of well-maintained splicing regulation. *GeroScience*. 2020; 42: 633–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00150-7>.
2. Gorbunova V, Bozzella MJ, Seluanov A. Rodents for comparative aging studies: from mice to beavers. *AGE*. 2008; 30: 111–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11357-008-9053-4>.
3. Smith M, Buffenstein R. Managed Care of Naked Mole-Rats. In: Buffenstein R, Park TJ, Holmes MM, editors. *The Extraordinary Biology of the Naked Mole-Rat*, vol. 1319. Cham: Springer International Publishing, 2021; p. 381–407.
4. Holloway GP, Holwerda AM, Miotto PM, Dirks ML, Verdijk LB,

- Van Loon LJC. Age-Associated Impairments in Mitochondrial ADP Sensitivity Contribute to Redox Stress in Senescent Human Skeletal Muscle. *Cell Reports*. 2018; 22: 2837–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.069>.
5. DeBoer MD. Animal models of anorexia and cachexia. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2009; 4: 1145–55. Available from: <https://doi.org/10.1517/17460440903300842>.
 6. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*. 2004; 116: 281–97. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
 7. Iossa S, Liverini G, Barletta A. Relationship between the resting metabolic rate and hepatic metabolism in rats: effect of hyperthyroidism and fasting for 24 hours. *Journal of Endocrinology*. 1992; 135: 45–51. Available from: <https://doi.org/10.1677/joe.0.1350045>.
 8. Parletta AC, Cerri GC, Gasparini CRB, Panico K, Vieira-Junior DN, Zacarias-Rodrigues LM, et al. Cardiac hypertrophy that affects hyperthyroidism occurs independently of the NLRP3 inflammasome. *Pflugers Arch — Eur J Physiol*. 2024; 476: 1065–75. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02965-6>.
 9. Osuna PM, Udovcic M, Sharma MD. Hypothyroidism and the Heart. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 2017; 13: 60. Available from: <https://doi.org/10.14797/mdcj-13-2-60>.
 10. Wang X, Song X, Si Y, Xia J, Wang B, Wang P. Effect of autophagy-associated proteins on the arecoline-induced liver injury in mice. *Exp Ther Med*. 2018. Available from: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6564>.
 11. McNab BK. The Metabolism of Fossorial Rodents: A Study of Convergence. *Ecology*. 1966; 47: 712–33. Available from: <https://doi.org/10.2307/1934259>.
 12. Rogers LK, Tipple TE, Britt RD, Welty SE. Hyperoxia exposure alters hepatic eicosanoid metabolism in newborn mice. *Pediatr Res*. 2010; 67: 144–9. Available from: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181c2df4f>.

References

1. Lee BP, Smith M, Buffenstein R, Harries LW. Negligible senescence in naked mole rats may be a consequence of well-maintained splicing regulation. *GeroScience*. 2020; 42: 633–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00150-7>.
2. Gorbunova V, Bozzella MJ, Seluanov A. Rodents for comparative aging studies: from mice to beavers. *AGE*. 2008; 30: 111–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11357-008-9053-4>.
3. Smith M, Buffenstein R. Managed Care of Naked Mole-Rats. In: Buffenstein R, Park TJ, Holmes MM, editors. *The Extraordinary Biology of the Naked Mole-Rat*, vol. 1319. Cham: Springer International Publishing, 2021; p. 381–407.
4. Holloway GP, Holwerda AM, Miotto PM, Dirks ML, Verdijk LB, Van Loon LJC. Age-Associated Impairments in Mitochondrial ADP Sensitivity Contribute to Redox Stress in Senescent Human Skeletal Muscle. *Cell Reports*. 2018; 22: 2837–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.069>.
5. DeBoer MD. Animal models of anorexia and cachexia. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2009; 4: 1145–55. Available from: <https://doi.org/10.1517/17460440903300842>.
6. Bartel DP. MicroRNAs. *Cell*. 2004; 116: 281–97. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5).
7. Iossa S, Liverini G, Barletta A. Relationship between the resting metabolic rate and hepatic metabolism in rats: effect of hyperthyroidism and fasting for 24 hours. *Journal of Endocrinology*. 1992; 135: 45–51. Available from: <https://doi.org/10.1677/joe.0.1350045>.
8. Parletta AC, Cerri GC, Gasparini CRB, Panico K, Vieira-Junior DN, Zacarias-Rodrigues LM, et al. Cardiac hypertrophy that affects hyperthyroidism occurs independently of the NLRP3 inflammasome. *Pflugers Arch — Eur J Physiol*. 2024; 476: 1065–75. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02965-6>.
9. Osuna PM, Udovcic M, Sharma MD. Hypothyroidism and the Heart. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*. 2017; 13: 60. Available from: <https://doi.org/10.14797/mdcj-13-2-60>.
10. Wang X, Song X, Si Y, Xia J, Wang B, Wang P. Effect of autophagy-associated proteins on the arecoline-induced liver injury in mice. *Exp Ther Med*. 2018. Available from: <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6564>.
11. McNab BK. The Metabolism of Fossorial Rodents: A Study of Convergence. *Ecology*. 1966; 47: 712–33. Available from: <https://doi.org/10.2307/1934259>.
12. Rogers LK, Tipple TE, Britt RD, Welty SE. Hyperoxia exposure alters hepatic eicosanoid metabolism in newborn mice. *Pediatr Res*. 2010; 67: 144–9. Available from: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181c2df4f>.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЙ ИНТЕРФЕРОН ТИПА 1, КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ ГЛИОБЛАСТОМЫ И МЕЛАНОМЫ

Е. Р. Набережная¹, А. В. Соболева¹, П. О. Воробьев¹, В. В. Вадекина¹, Г. М. Юсубалиева^{1,2,3}, И. В. Исаева², В. П. Баклаушев^{1,2,3,4}, П. М. Чумаков¹, А. В. Липатова¹✉

¹ Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Иммунотерапия онколитическими вирусами (ОВ) становится полноценным методом неoadъювантной терапии в парадигме доказательной медицины для все большего числа онкологических заболеваний. Особенно актуально применение ОВ для иммунологически «холодных» опухолей, вызывающих минимальный иммунный ответ и обладающих выраженным иммуносупрессивным опухолевым микроокружением. Для стимуляции противоопухолевого ответа применимы рекомбинантные ОВ, несущие последовательности иммуноактивирующих белков. Целью работы было исследовать онкоселективность и противоопухолевую активность рекомбинантного ОВ, созданного на базе штамма LVP вируса осповакцины, экспрессирующего последовательности интерферона-альфа человека и мыши (hIFN α и mIFN α соответственно). В экспериментах с помощью метода Рида и Менча было показано, что созданные рекомбинантные ОВ проявляют онкоселективность в отношении опухолевых линий соответствующего вида. Для LVP-hIFN α показана способность эффективно заражать линии аденокарциномы и глиобластомы человека. Для LVP-mIFN α *in vitro* продемонстрирована селективность в отношении глиомы Gl261 и меланомы B16. В эксперименте *in vivo* на мышах линии C57Bl/6 с подкожной меланомой B16 показана способность LVP-mIFN α после внутривенного введения уменьшать объем подкожного аллогraftа опухоли и увеличивать инфильтрацию опухоли CD8⁺- и NK-клетками. Созданный рекомбинантный вирус может быть потенциальной платформой для разработки онколитической виротерапии меланомы и глиобластомы человека.

Ключевые слова: онколитические вирусы, интерферон, вирусный онколиз, рекомбинантные штаммы вируса осповакцины

Финансирование: создание рекомбинантных штаммов вируса осповакцины было выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-14-00370, изучение их свойств на моделях *in vitro* и *in vivo* проводилось при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-64-00057, гистологические и иммуногистохимические исследования опухолевой ткани проводили при поддержке ФМБА России.

Вклад авторов: Е. Р. Набережная — реализация экспериментов *in vitro* и *in vivo*, написание рукописи; А. В. Соболева — получение данных проточной цитометрии, определение чувствительности линий к вирусам; П. О. Воробьев — создание рекомбинантных вирусов, наработка препаративных количеств штаммов; В. В. Вадекина — проведение экспериментов *in vivo*; Г. М. Юсубалиева — интерпретация данных эксперимента *in vivo*, написание статьи; И. В. Исаева — проведение гистологического и иммуногистохимического исследования; В. П. Баклаушев — проведение микроскопии, описание гистологических и иммуногистохимических данных, подготовка рисунка, написание статьи; П. М. Чумаков, редактирование рукописи; А. В. Липатова — концепция исследования, общее руководство проектом.

Соблюдение этических стандартов: исследование *in vivo* одобрено этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФМБА России (протокол № 7 от 06 сентября 2022 г.), проведено в соответствии с рекомендациями Коллегии ЕЭК от 14.11.2023 № 33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований». Число животных в группах было минимизировано, размеры подкожных опухолей в группах не превышали 2000 мм³. Эксперименты *in vitro* проведены на коммерчески доступных линиях клеток животных и человека.

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

Статья получена: 26.11.2024 Статья принята к печати: 19.12.2024 Опубликовано онлайн: 30.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.072

INTERFERON TYPE I-EXPRESSING RECOMBINANT VACCINIA VIRUS AS A PLATFORM FOR SELECTIVE IMMUNOTHERAPY OF GLIOBLASTOMA AND MELANOMA

Naberezhnaya ER¹, Soboleva AV¹, Vorobyev PO¹, Vadekhina VV¹, Yusubalieva GM^{1,2,3}, Isaeva IV², Baklaushev VP^{1,2,3,4}, Chumakov PM¹, Lipatova AV¹✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Science, Moscow, Russia

² Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁴ Research Institute of Pulmonology of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Immunotherapy with oncolytic viruses (OVs) becomes a full-fledged neoadjuvant therapy method in the paradigm of evidence-based medicine for the growing number of cancers. The use of OVs for immunologically “cold” tumors causing minimal immune response and having the clearly immunosuppressive tumor microenvironment is especially relevant. Recombinant OVs carrying the sequences of proteins activating the immune system can be used to stimulate antitumor response. The study aimed to assess oncospecificity and antitumor activity of the recombinant OV designed based on the LVP vaccinia virus strain showing expression of human and murine interferon alpha sequences (hIFN α and mIFN α , respectively). The *in vitro* experiments showed that the recombinant OVs designed showed oncospecificity in relation to tumor cell lines of appropriate species. The ability to effectively infect human adenocarcinoma and glioblastoma cell lines was reported for LVP-hIFN α . LVP-mIFN α showed selectivity in relation to glioma Gl261 and melanoma B16 *in vitro*. The *in vivo* experiment involving the C57Bl/6 mice with subcutaneous melanoma B16 showed the ability of the intravenously administered LVP-mIFN α to reduce the size of the subcutaneous tumor allograft and increase tumor infiltration with the CD8⁺ and NK cells. The recombinant virus designed can be a potential platform for the development of oncolytic virotherapy of human melanoma and glioblastoma.

Keywords: oncolytic viruses, interferon, viral oncolysis, recombinant vaccinia virus strains

Funding: the design of recombinant vaccinia virus strains was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-14-00370, and assessment of their properties in *in vitro* and *in vivo* models was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-64-00057; histologic and immunohistochemical assessment of tumor tissue was supported by FMBA of Russia.

Author contribution: Naberezhnaya ER — implementation of *in vitro* and *in vivo* experiments, manuscript writing; Soboleva AV — flow cytometry data acquisition, determining the cell line sensitivity to viruses; Vorobyev PO — designing recombinant viruses, production of preparative amounts of strains; Vadekhina VV — conducting *in vivo* experiments; Yusubalieva GM — interpretation of *in vivo* experimental data, manuscript writing; Isaeva IV — histologic and immunohistochemical assessment; Baklaushev VP — microscopy, describing histology and immunohistochemistry data, preparing a drawing, manuscript writing; Chumakov PM — manuscript editing; Lipatova AV — study concept, general project management.

Compliance with ethical standards: the *in vivo* study was approved by the Ethics Committee of the Federal Scientific and Clinical Center of FMBA of Russia (protocol No. 7 dated 06 September 2022) and conducted in accordance with the Eurasian Economic Commission Board's guidelines No. 33 dated 14 November 2023 "On the Guidelines for handling laboratory (experimental) animals when conducting preclinical (non-clinical) studies". The number of animals per group was minimized; the subcutaneous tumor size in the groups did not exceed 2000 mm³. *In vitro* experiments involved the commercially available animal and human cell lines.

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

Received: 11.12.2024 Accepted: 24.12.2024 Published online: 30.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.072

Несмотря на наличие множества терапевтических подходов, включающих современную хирургию с интраоперационной навигацией, современную радиотерапию, современную неoadъювантную терапию таргетными препаратами, ингибиторами контрольных иммунных точек и другие, продолжительность жизни пациентов при некоторых онкологических заболеваниях, таких как глиобластома, метастатическая меланома и ряд карцином с первичным метастазированием, остается крайне низкой. Именно поэтому актуальны исследования и разработки новых терапевтических подходов, направленных на элиминацию или предотвращение отдаленных метастазов.

Важным требованием к разработке новых противоопухолевых средств является высокоизбирательное онколитическое действие, способность обнаруживать и уничтожать только злокачественные/метастатические опухолевые клетки. Поэтому идеальными кандидатами на разработку онкоселективных средств являются непатогенные или аттенуированные вирусы. Онкоселективные терапевтические штаммы способны разрушать опухолевые клетки, эффективно реплицируясь в них, не повреждая при этом нормальные ткани [1].

В настоящее время особое внимание уделяется применению вирусов семейства *Poxviridae* в качестве прототипов онколитических вирусов для лечения метастазирующих карцином и меланомы. Перспективным онколитическим вирусом семейства *Poxviridae* является вирус осповакцины (*vaccinia virus*, VV) [2], в частности, российский биовариант штамма Листер — LIVP VV. Данный штамм широко применяли в международной программе ликвидации оспы, и он обладает исключительной онкоселективностью [3, 4], в особенности после инактивации гена тимидинкиназы, что приводит к избирательной репликации вируса в опухолевых клетках, богатых данным ферментом [5].

Для повышения противоопухолевых свойств аттенуированных штаммов VV конструируют рекомбинантные штаммы VV, экспрессирующие различные трансгены [6]. На данный момент известно множество трансгенов, которые проявили свою эффективность при экспрессии в VV, включая гены цитокинов и их рецепторов [7], иммуностимуляторов [8–10], онкотоксических белков [11], ингибиторов ангиогенеза [12].

В данной работе были сконструированы высокоонкоселективные штаммы вируса осповакцины, экспрессирующие человеческий или мышинный IFN α и tagRFP в составе бицистронной кассеты. Экспрессия IFN α рекомбинантным онколитическим штаммом может усиливать не прямое иммуноопосредованное онколитическое действие, за счет индукции экспрессии комплекса гистосовместимости I класса, увеличения активности цитотоксических Т-лимфоцитов, активации Т-хелперных клеток, макрофагов и NK-клеток [13].

Секреция интерферона в нормальных клетках приостанавливает трансляцию белка и клеточный цикл, замедляет метаболизм [14], поэтому, защищая клетки от вирусов, интерфероновые механизмы мешают пролиферации опухолевых клеток. Микроэволюция развивается таким образом, что в опухолевых клетках накапливаются ошибки в сигнальных путях индукции интерферона и интерферонного ответа, вследствие чего клетки могут утрачивать способность переходить в противовирусное состояние [15, 16]. Утрата механизмов интерфероновой защиты является одним из факторов, обуславливающих бесконтрольную пролиферацию опухолевых клеток [17].

Еще одним фактором, который делает онколитическую виротерапию перспективной, является способность ОВ стимулировать продолжительный противоопухолевый иммунный ответ [18]. Вирусы разрушают опухолевые клетки, и высвобождаются различные молекулы, такие как опухоль-ассоциированные антигены; патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями и цитокины [19]. Эти молекулы способствуют активации иммунных клеток, таких как антигенпрезентирующие клетки и Т-клетки, что формирует эффективный адаптивный иммунный ответ против опухоли [20, 21].

Интерфероны I типа ингибируют репликацию вируса в нормальных клетках, но в опухолевых клетках их действие не так эффективно [8, 17]. Благодаря этому интерфероны I типа обладают противоопухолевым действием, они способны индуцировать опухольспецифические цитотоксические Т-лимфоциты и активировать антиангиогенные факторы [22]. Примечательно, что сам по себе VV ингибирует систему интерферонного ответа посредством экспрессии некоторых генов [22]. Цель работы — оценить вклад экспрессии интерферона вирусом осповакцины в онколитическую активность вируса *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы вируса осповакцины, используемые в работе

LIVP-hIFN α — вирус осповакцины, экспрессирующий человеческий IFN α и tagRFP; LIVP-mIFN α — вирус осповакцины, экспрессирующий мышинный IFN α и tagRFP; LIVP-RFP — вирус осповакцины, экспрессирующий tagRFP.

Культуры клеток, используемые в работе

VHK-21 — эмбриональная линия почки хомяка; HEK293T — трансформированная эмбриональная линия почки человека, содержащая SV40-антиген; U-87 MG, DBTRG-05MG, U251-MG, PrGlioma 3821, PrGlioma 6067, PrGlioma 6138 — линии глиобластомы человека; HeLa — линия клеток аденокарциномы шейки матки; HEF — эмбриональная линия фибробластов человека; Embr.astro — эмбриональная линия астроцитов человека; B16 — мышинная меланома; 4T1 — мышинная аденокарцинома молочной железы.

Клеточные линии культивировали на среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) (HyClone, США), антибиотика пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 2 мМ L-глутамин. Клетки инкубировали при температуре 37 °C и 5% CO $_2$, пассировали каждые 3–5 дней.

Создание рекомбинантных штаммов вируса осповакцины, экспрессирующих кДНК IFN α мыши и человека

Получение плазмидных конструций для рекомбинации

Для получения фрагмента кДНК мышинного IFN α самку мыши линии Balb/c инфицировали вирусом Сендай (Москва) в количестве 10 9 инфекционных частиц. Через 24 ч мышью подвергали эвтаназии. мРНК экстрагировали из селезенки (total RNA isolation kit, Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. кДНК получали методом обратной транскрипции с помощью набора для синтеза кДНК Superscript III в соответствии с инструкциями производителя. Фрагменты

амплифицировали с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров:

Прямой: 5'-ATGGCTAGGCTCTGTG-3'

Обратный: 5'-TTTCTCTCTCAGTCTTCCCA-3'

кДНК человеческого IFN α была получена путем ревертирования тотальной РНК периферических мононуклеаров крови здорового донора. Последовательности праймеров, использованных для амплификации:

Прямой 5'-ATGGCCTCGCCCTTTC-3'

Обратный: 5'-TTCCCTCCTCCTTAATCTTCTTGCAAG-3'

После получения ампликона была проведена повторная ПЦР с праймерами, содержащими рестрикционные сайты. Далее в шаттл-вектор, разработанный ранее в лаборатории пролиферации клеток, производили клонирование по липким концам. Готовые конструкции подвергали секвенированию по методу Сэнгера.

Полученные конструкции трансфецировали в клетки линии HEK293T с использованием PEI [23], после чего инфицировали биовариантом L1VP штамма Листер вируса осповакцины. Методом бляшек рекомбинантные штаммы отобрали на линии ВНК-21 [7], а также наработали в препаративных количествах, как было описано ранее [24].

Определение чувствительности линий опухолевых клеток к штаммам вируса осповакцины

Чувствительность линий опухолевых клеток к штаммам вируса осповакцины определяли с помощью окрашивания резазурином. Для этого клетки рассеивали на 96-луночные планшеты, далее инфицировали 10-кратными серийными разведениями вируса. В качестве контроля использовали среду, не содержащую вирус. Далее инкубировали при 37 °C, 5% CO₂. Через 72 ч после инфицирования проводили оценку цитотоксичности. Тест основан на возможности жизнеспособных клеток превращать резазурин в резорурфин путем окислительно-восстановительных реакций. Клетки инкубировали в течение 4 ч с красителем. Далее измеряли уровень флуоресценции при длине волны 590 нм с использованием длины волны возбуждения 560 нм на микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). По полученным данным определяли количество живых клеток в процентах относительно не зараженного контроля и считали величины показателя TCID₅₀.

Оценка вирусной кинетики методом проточной цитометрии

Экспрессия RFP в инфицированных клетках коррелирует с репликацией вируса. Клеточные линии рассеивали на 24-луночные планшеты в количестве 10⁵ клеток на лунку. Далее клетки инфицировали L1VP-hIFN α в MOI 5, 1 и 0,2. Клетки собирали через 24, 48, 72, 96 ч после заражения для анализа методом проточной цитометрии. Образцы анализировали путем детектирования красной флуоресценции в PE-канале с использованием цитофлуориметра BD LSR Fortessa (Beckman Dickinson, Franklin Lakes, NJ, США) с 10 000 событиями на образец.

Оценка функциональной активности интерферона, экспрессируемого вирусами

Вирус везикулярного стоматита (штамм Индиана) является штаммом, чувствительным к противовирусному состоянию клетки, не способным оказывать цитопатогенное действие

на клетках с сохраненной системой интерфероновой ответа после обработки интерфероном. Супернатант, содержащий IFN α , получали из вирусосодержащей среды, снятой с клеток ВНК-21, инфицированных в множественности 0,1 штаммом L1VP-hIFN α , или линии HEK293T в случае с штаммом L1VP-mIFN α . Вирусосодержащую среду собирали через 48 ч, осветляли путем центрифугирования при 4 °C 4000 rpm 20 мин, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и получали супернатант, содержащий IFN α . В фильтрованном супернатанте оставались лишь следовые количества вируса осповакцины. Опухолевую клеточную линию обрабатывали в трех повторностях рекомбинантным человеческим IFN α 2 β (Фармаклон, Россия) или мышинным рекомбинантным интерфероном альфа (752802, Biolegend, США) в различных концентрациях, и супернатантом с интерферонами IFN α в различных концентрациях. В качестве контроля использовали супернатант с клеток, инфицированных L1VP-RFP и клетки без обработки интерфероном. Спустя день после обработки интерфероном на флуоресцентном микроскопе проверяли отсутствие вирусной инфекции. Через 24 ч после обработки супернатантом/интерфероном клетки инфицировали VSV в разных множественностях (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001). Через 24 ч проводили оценку цитопатического действия относительно не зараженного VSV контроля. И считали TCID₅₀ по методу Рида и Менча.

Моделирование подкожной меланомы у мышей линии C57Bl/6, введение вирусов

Самкам ($n = 12$) и самцам ($n = 12$) мышей линии C57Bl/6 в возрасте 6–8 недель для создания модели мышинной меланомы подкожно, над задним бедром, вводили 10⁶ клеток линии B16. Каждый день производили оценку роста и развития опухолей с помощью визуального осмотра и измерения размеров узла опухоли с использованием штангенциркуля. На седьмые сутки мышей с подтвержденным ростом подкожных аллогraftов опухоли случайным образом распределяли на три группы — L1VP-mIFN α ($n = 8$), L1VP-RFP ($n = 8$) и контроль ($n = 8$), по 4 самки и по 4 самца в каждой группе. Вирусосодержащие растворы L1VP-mIFN α и L1VP-RFP в количестве 5 × 10⁶ БОЕ/мл растворяли в 100 мкл PBS и внутривенно вводили мышам соответствующих групп на 7-й и 10-й дни после имплантации опухолей. Животным контрольной группы в те же временные точки вводили физиологический раствор. За животными наблюдали в течение 24 дней, измеряли объем опухоли, чтобы оценить динамику ее роста или регрессии. Размеры опухолей измеряли до начала лечения, а затем каждые 2 дня. Объем опухоли вычисляли с использованием формулы:

$$V = \frac{a \cdot b^2}{2}, \quad (3)$$

где a — меньшее из двух ортогональных измерений опухоли, b — второе ортогональное измерение. Затем, в каждой группе вычисляли средний объем опухоли ($V_{ср}$).

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование

Гистологическое исследование проводили на трех дополнительных группах мышей C57Bl/6, которым вводили L1VP-mIFN α ($n = 3$), L1VP-RFP ($n = 3$) и физиологический раствор ($n = 3$) так же, как мышам основных групп.

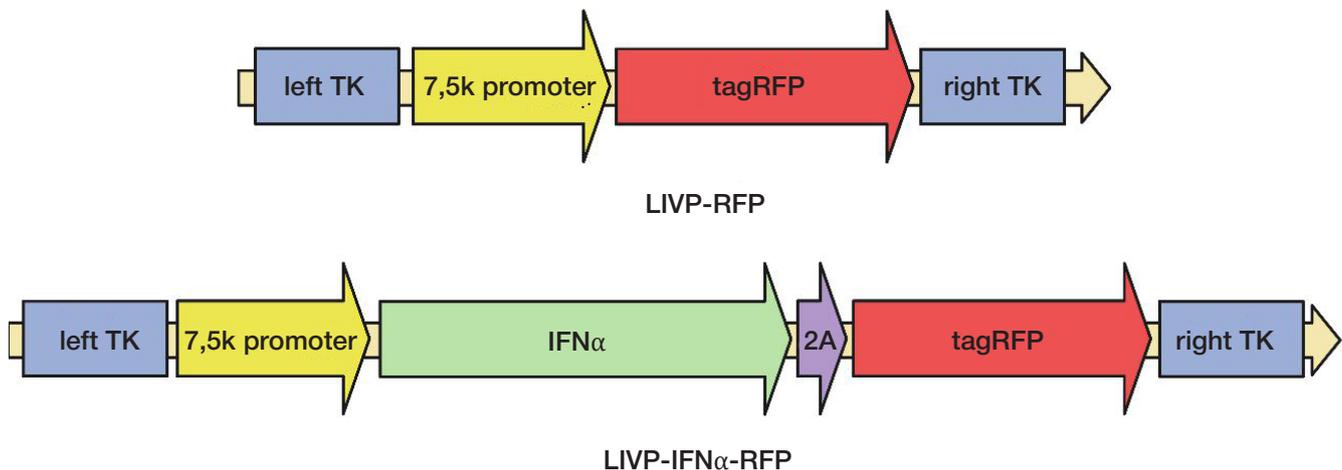


Рис. 1. Схематичная иллюстрация конструкции плазмиды

На 24-е сутки после имплантации опухоли (14-е сутки после последнего введения вирусов) животных глубоко наркотизировали внутривенным введением запредельной дозы пропофола, после возникновения апноэ мышей подвергали эвтаназии путем дислокации шейных позвонков, подкожные аллогraftы опухолей аккуратно выделяли вместе с окружающей клетчаткой во избежание повреждения кистозных полостей и помещали в десятикратный объем 10%-го нейтрального забуференного формалина на 72 ч. Фиксированные ткани дегидратировали в растворах этанола восходящей концентрации (70%, 80%, 96%), затем в изопропанол и О-ксилол, после чего заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм приготавливали с помощью ротационного микротом и монтировали на предметные стекла. Перед окрашиванием срезы депарафинировали в О-ксилол, изопропанол и этаноле. Для проведения гистологического исследования срезы окрашивали гематоксилином в течение 10 мин, промывали дистиллированной водой, затем проточной водопроводной водой и докрашивали эозином в течение 30 с. Далее срезы повторно дегидратировали в 96%-м этаноле, изопропанол и О-ксилол и монтировали с помощью среды «Витрогель» и покровных стекол толщиной 0,15 мм. Иммунопероксидазное окрашивание парафиновых срезов на маркеры иммунных клеток проводили с помощью иммуноштейнера Benchmark Ultra Immunostainer (Ventana, США) с применением первичных антител к CD4, CD8, CD56 (Roche, США) и набора OptiView DAB IHC Detection Kit (Roche, США) в соответствии с протоколами производителя. Окрашенные и покрытые покровными стеклами препараты сканировали с помощью сканера Leica Aperio GT450 DX (Leica Biosystems, США) и обрабатывались при 20-кратном увеличении с помощью программного обеспечения Aperio ImageScope.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание рекомбинантных штаммов

Ген $IFN\alpha$ — один из перспективных трансгенов, способный повысить онкоселективность вируса благодаря своим иммуностимулирующим свойствам и ингибированию вирусной репликации в нормальных тканях. В нашей работе были созданы рекомбинантные штаммы биоварианта LIVP, экспрессирующие под управлением промотора p7,5k VV $IFN\alpha$ (человека или мыши) в составе бицистронной кассеты с красным флуоресцентным белком RFP (рис. 1). Применение

данного раннего промотора позволило добиться высокого уровня экспрессии интерферона в опухолевых клетках.

Для дальнейшего культивирования рекомбинантного штамма вируса осповакцины была выбрана клеточная культура ВНК-21 как высокочувствительная к вирусу осповакцины. Рекомбинантные варианты экспрессировали флуоресцентный белок (рис. 2). Корректность экспрессии трансгена была подтверждена путем секвенирования по Сэнгеру ампликонов транскриптов, фланкированных участками гена тимидинкиназы вируса осповакцины.

Эффективность репликации вируса в различных опухолевых линиях была определена методом проточной цитометрии спустя 24, 48, 72 и 96 ч после инфицирования вирусом. Были протестированы опухолевые клеточные линии человека: (аденокарцинома HeLa, глиобластома U251-MG) и мыши (меланома B16, аденокарцинома 4T1). Клеточная линия ВНК-21 была использована в качестве эталонной. Клеточные культуры HeLa и U251-MG были инфицированы в MOI 1 и 0,1 штаммами LIVP-hIFN α , LIVP-RFP. Клеточные культуры B16 и 4T1 инфицированы в тех же множественностях штаммами LIVP-mIFN α , LIVP-RFP. Через 24, 48, 72 и 96 ч после заражения определяли процент RFP-положительных клеток.

Было обнаружено, что рекомбинантный штамм LIVP-mIFN α слабо реплицируется в аденокарциноме 4T1, но при MOI 1 дает более чем 20%-й уровень репликации в меланоме B16 (рис. 3). LIVP-hIFN α показал эффективную репликацию в культурах опухолевых клеток человека. Спустя 24 ч линия HeLa при инфицировании различными множественностями показала максимальную заражаемость среди исследованных линий: MOI 1 — $34,44 \pm 1,38\%$, MOI 0,1 — $7,82 \pm 0,96\%$. Примечательно, что в культуре глиобластомы человека при MOI 1 через 96 ч после заражения репликация вируса LIVP-hIFN α не отличалась от контрольного и составляла почти 100%. Для подтверждения гипотезы об онкоселективности LIVP-hIFN α в отношении глиобластомы мы протестировали его цитопатогенное действие на расширенной панели линий этой опухоли.

Оценка цитопатогенного действия рекомбинантных штаммов на панели опухолевых и нормальных клеточных линий

На панели опухолевых и нормальных клеток человека и мыши была исследована онколитическая активность вируса осповакцины, экспрессирующего интерфероны альфа, в сравнении со штаммом, экспрессирующим tagRFP. С

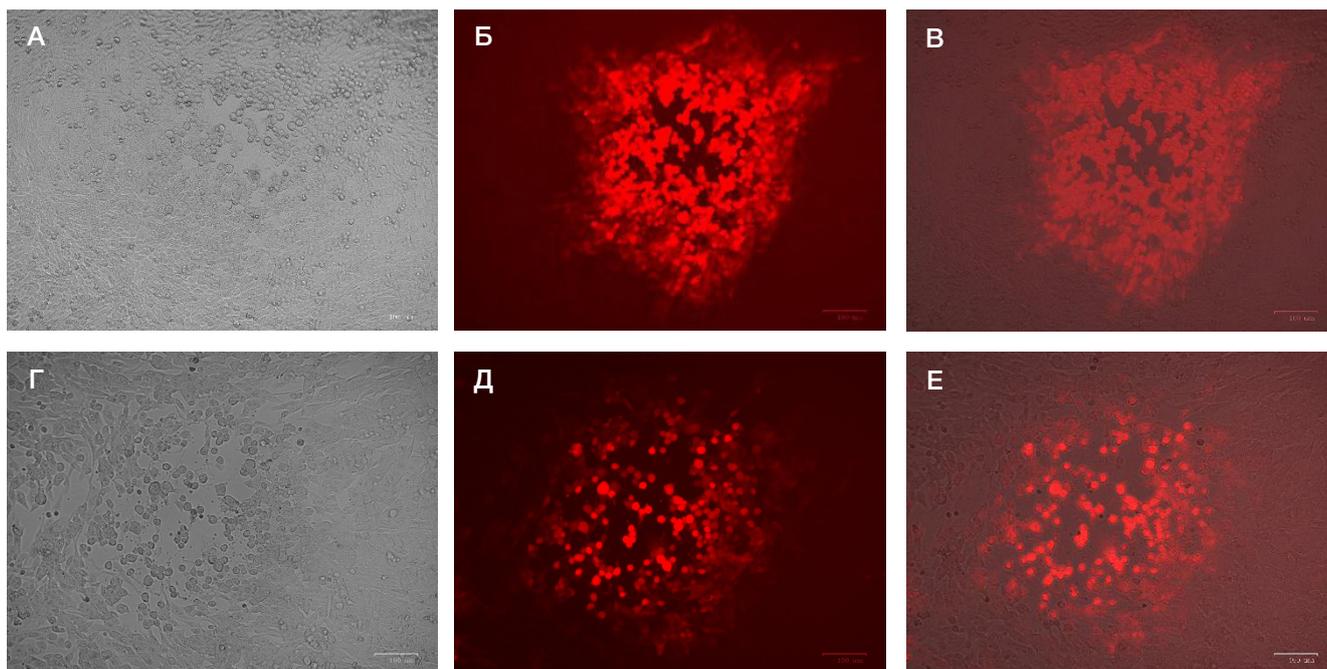


Рис. 2. Фотографии клеток ВНК-21 через 24 ч после инфицирования LVP-mIFN α (А–В) и LVP-hIFN α (Г–Е) (А, Г — в светлом поле; Б, Д — в красном флуоресцентном канале; В, Е — совмещенное изображение. Увеличение: $\times 200$; отрезок = 100 мкм)

помощью титрования вируса LVP-hIFN α по методу Рида и Менча и определения величины TCID₅₀, была оценена чувствительность клеточных линий глиобластомы U-87 MG, DBTRG-05MG, U251-MG, PrGlioma 3821, PrGlioma 6067, PrGlioma 6138 (рис. 4А), а также две нормальные клеточные линии: эмбриональная линия фибробластов человека HEF, эмбриональная линия астроцитов человека Embr.astro. Штамм, экспрессирующий мышинный интерферон, был протестирован на линиях мышинной глиомы CT2A и GL261, а также на аденокарциноме 4T1 и меланоме B16 (рис. 4Б).

Исследование на панели линий глиобластомы человека показало достаточно высокую чувствительность этих линий к LVP-hIFN α , сопоставимую с чувствительностью клеток глиобластомы к контрольному вирусу, экспрессирующему tagRFP (рис. 4). Было обнаружено, что нормальные фибробласты и астроциты имеют меньшую чувствительность к вирусу осповакцины, экспрессирующему hIFN α , чем к вирусу, экспрессирующему tagRFP. Эти данные свидетельствуют о том, что полученный рекомбинантный штамм является более онкоселективным, по сравнению с контрольным штаммом LVP-RFP. Одинаковая чувствительность исследованных линий к вирусам, экспрессирующим IFN α и tagRFP, в свою очередь свидетельствует, что прямая цитопатическая активность вируса, экспрессирующего интерферон, по отношению к опухолевым клеткам сохранилась.

Исследование функциональной активности интерферонов, экспрессируемых вирусом осповакцины

Функциональную активность экспрессируемых интерферонов определяли классическим тестом с использованием вируса везикулярного стоматита (VSV). Вирус везикулярного стоматита чувствителен к противовирусному состоянию, т. е. не способен оказывать цитопатогенное действие на клетки с сохраненной системой интерферонового ответа после обработки интерфероном. Было показано, что опухолевые клеточные линии U87-MG и B16 имеют сохранную систему интерферонового ответа [25].

Клеточные культуры обрабатывали профильтрованным супернатантом, снятым с клеток, инфицированных LVP-hIFN α или LVP-mIFN α , а также заводскими рекомбинантными IFN α (рис. 5). В качестве контроля использовали клетки без обработки интерфероном и клетки, обработанные профильтрованным супернатантом, который был снят с клеток, инфицированных LVP-RFP.

Супернатант для эксперимента с человеческим интерфероном был снят с клеточной линии ВНК-21, инфицированной LVP-hIFN α . Супернатант для эксперимента с штаммом LVP-mIFN α получили с клеток линии HEK293T, так как мышинный и хомячковый интерфероны обладают кроссактивностью.

Спустя день после обработки интерфероном на флуоресцентном микроскопе проверяли отсутствие вирусной инфекции. Через 24 ч после обработки интерфероном клетки инфицировали VSV в разных множественностях инфекции.

ЦПД вируса везикулярного стоматита полностью отсутствовало при обработке клеток рекомбинантным интерфероном в концентрации 320 ед./мл, или 2%-м разведении кондиционированной среды в случае человеческого интерферона. Для мышинного интерферона ЦПД отсутствовало при обработке клеток рекомбинантным интерфероном в концентрации 6,6 нг/мл или 0,25%-м разведении кондиционированной среды.

Противоопухолевая активность LVP-mIFN α *in vivo*

Онколитическую активность вируса осповакцины LVP-mIFN α исследовали на мышах линии C57Bl/6 с мышинной меланомой B16 (рис. 6). Внутривенная виротерапия была проведена на 7-й и 10-й дни после имплантации опухоли. Контрольной группе мышей был введен физиологический раствор.

Объем опухолей измеряли через день. При лечении вирусом осповакцины наблюдали меньший объем опухолей по сравнению с контрольной группой, особенно при лечении вирусом, экспрессирующим мышинный интерферон альфа.

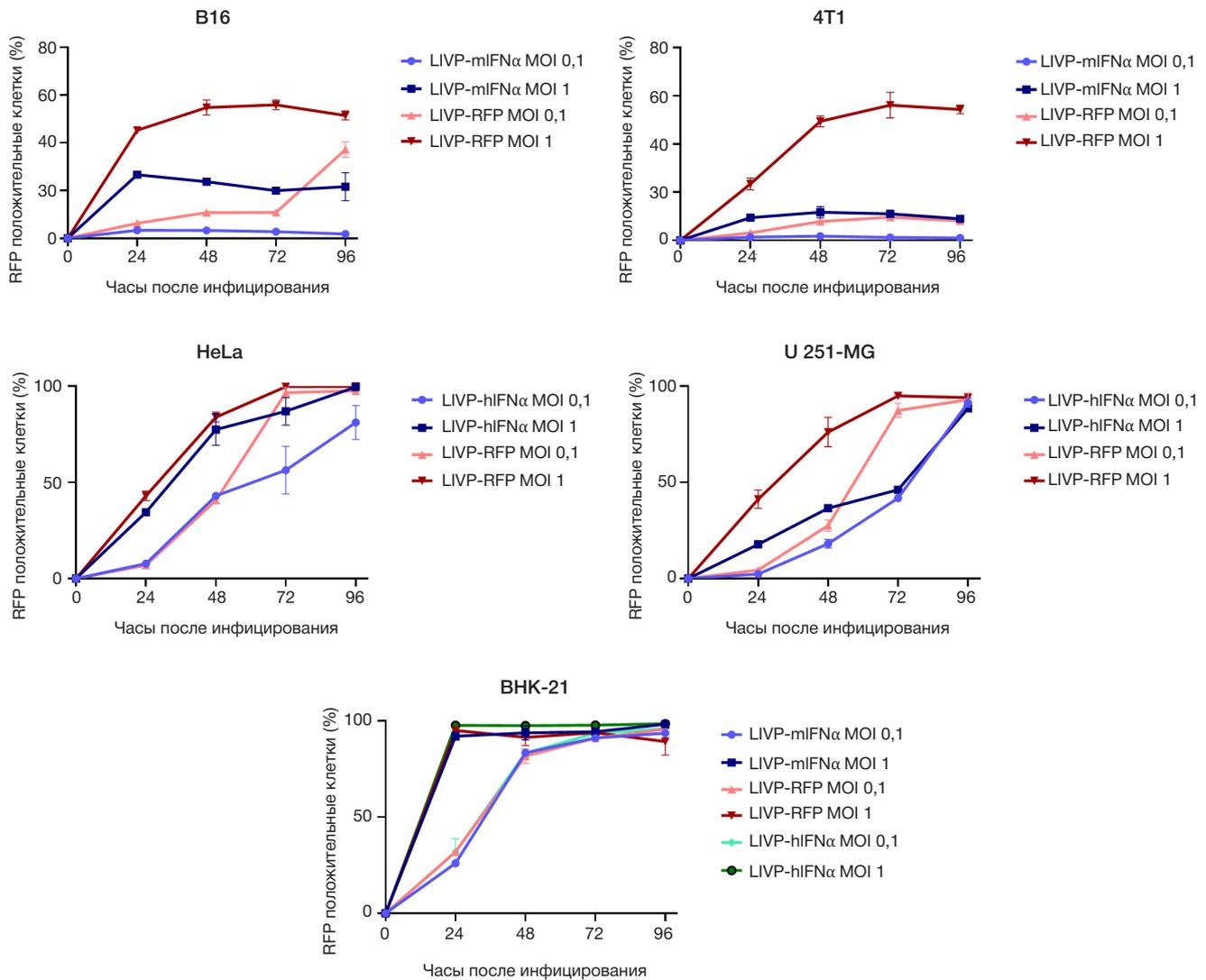


Рис. 3. Оценка кинетики репликации вируса через 24, 48, 72 и 96 ч после инфицирования рекомбинантным штаммом VV на различных клеточных линиях

Средний объем опухолей в контрольной группе составил 1800 мм³, в группе, получавшей LIVP-RFP, — 1450 мм³, а в группе, получавшей вирус с мышинным интерфероном альфа, — 650 мм³ (p -value < 0,01). Снижение объема опухолей по сравнению с группой контроля составило 64% (рис. 6).

Гистологический анализ подкожных аллогraftов опухолей на 24-е сутки после имплантации (14-е сутки после последнего введения вирусов) показал гетерогенную гиперцеллюлярную структуру опухоли с участками некрозов и кровоизлияний, с включениями меланина и гистиоцитарной инфильтрацией. В препаратах животных, получивших внутривенную терапию онколитическими вирусами, наблюдали сливные некрозы с выраженной гистиоцитарной инфильтрацией (рис. 7; H & E). Иммуногистохимический анализ показал наличие инфильтрации CD4⁺, CD8⁺-Т-клетками и CD56⁺-NK клетками во всех исследуемых образцах. При этом в препаратах после терапии VV наблюдалось значимо более высокое содержание цитотоксических Т-клеток и NK-клеток (до 40 в поле зрения) (рис. 7). Полученные результаты позволяют заключить, что репликация рекомбинантных вирусов существенно снижает иммунологическую «холодность» меланомы B16, способствуя инфильтрации стромы опухоли иммунокомпетентными клетками.

Резюмируя полученные результаты, можно заключить, что разработанный онкоселективный штамм вируса осповакцины, экспрессирующий функционально активный мышинный интерферон альфа, обладает существенной противоопухолевой активностью на модели мышинной меланомы B16.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ДНК-содержащий вирус осповакцины является перспективной платформой для создания селективных рекомбинантных онколитических штаммов, поскольку его геном может вмещать вставки размером до 25 т.п.н. [6]. К настоящему моменту созданы и успешно испытаны в доклинических и клинических исследованиях рекомбинантные штаммы VV, содержащие последовательности цитокинов, хемокинов, онкотоксических белков [11], бактериальных иммуоатрактантов (например, лиганда рецептора врожденной иммунной системы TLR5 флагеллина [10]) и других белков, активирующих противоопухолевый иммунный ответ и рекрутирующих в опухоль цитотоксические иммунные клетки [7, 26, 27].

Рекомбинантный штамм вируса JX-594, содержащий делецию в гене тимидинкиназы (ТК), а также последовательность гранулоцитарно-макрофагального

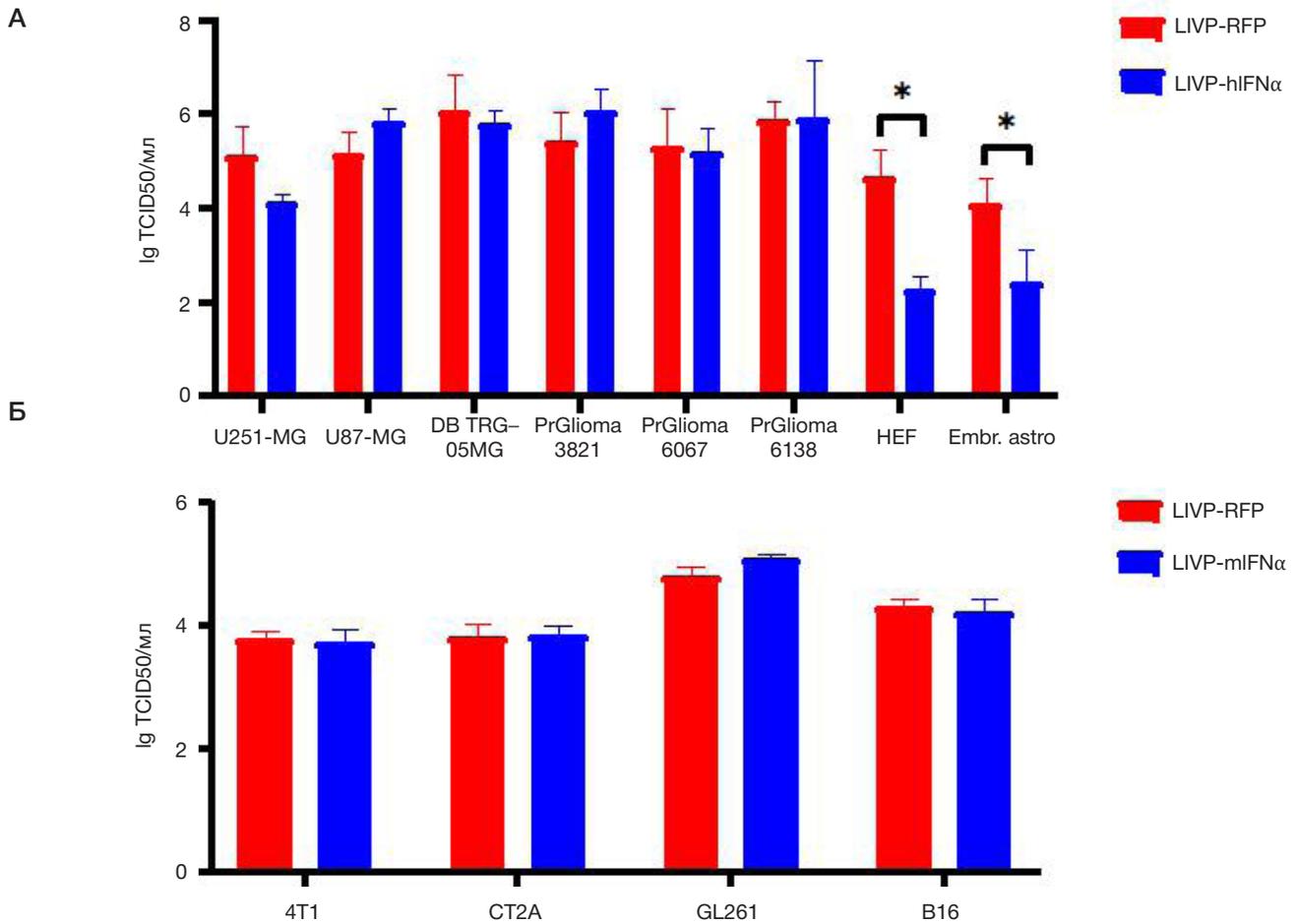


Рис. 4. Чувствительность опухолевых и нормальных клеточных линий к вирусу осповакцины, экспрессирующему tagRFP и **А)** экспрессирующему человеческий IFN α и **Б)** мышинный IFN α . По оси абсцисс показаны линии опухолевых клеток, по оси ординат — IgTCID₅₀/мл

колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и трансгену lac-Z, показал весьма обнадеживающие результаты во II фазе клинических испытаний онколитической терапии метастазов в печени колоректального рака и меланомы. Введенный внутривенно вирус JX-594 обнаруживался в опухолевой ткани, что сопровождалось секрецией IFN α , индукцией хемокинов и активацией противоопухолевого иммунного ответа [26].

В нашем исследовании с целью повышения онкоселективности мы также использовали штамм LIVP с дефектным геном ТК — фермента, необходимого для синтеза ДНК вируса, который практически не экспрессируется в процессе нормального клеточного цикла, но высоко экспрессирован в низкодифференцированных опухолевых клетках [28]. Мы предположили, что включение в рекомбинантный вирус осповакцины последовательности IFN α может усилить селективность репликации вируса в опухолевых клетках, в которых интерфероновый сигналинг часто дефектен, а также будет способствовать активации NK-клеток, макрофагов и цитотоксических Т-клеток в ответ на опухольспецифичную репликацию вируса и таким образом, способствовать эффективной эрадикации опухоли.

Эксперименты с определением величины TCID₅₀ для опухолевых и нормальных клеточных линий подтвердили наше предположение о повышенной онкоселективности LIVP-hIFN α , показав, что нормальные клетки имеют меньшую чувствительность к вирусу осповакцины, экспрессирующему IFN α , чем к вирусу, экспрессирующему tagRFP. Эксперименты со снижением

ЦПД вируса везикулярного стоматита после обработки клеток глиобластомы человека и аденокарциномы мыши супернатантами от зараженных LIVP-hIFN α и LIVP-mIFN α клеток соответственно, подтвердили, что экспрессируемый зараженными клетками IFN α является функционально активным. Наиболее чувствительной к LIVP-hIFN α оказалась линия HeLa, что позволяет предполагать потенциальную применимость созданного рекомбинантного вируса для терапии аденокарцином. Обнаруженная нами чувствительность к LIVP-hIFN α у клеток глиобластомы U251-MG показала весьма интересной с точки зрения возможного практического применения данного вируса в терапии глиальных опухолей. Это предположение было подтверждено нами еще на пяти линиях этой опухоли, включая первичные культуры глиобластомы, имеющиеся в нашем распоряжении. Эти данные позволяют предположить, что LIVP-hIFN α может быть перспективным онколитическим вирусом для терапии глиобластомы.

Результаты исследований *in vivo* на мышинной модели меланомы B16 подтвердили наше предположение о высокой онкоселективности LIVP-mIFN α и усиленной онколитической активности. Снижение объема опухоли у животных, получивших внутривенную терапию LIVP-mIFN α на 64% по сравнению с контрольными животными, убедительно свидетельствует о преимуществах созданного нами рекомбинантного VV, приводящего к секреции зараженными клетками функционально активного IFN α . Иммуногистохимические исследования показали высокий уровень инфильтрации опухолей, пролеченных LIVP-mIFN α CD8⁺-Т-клетками и

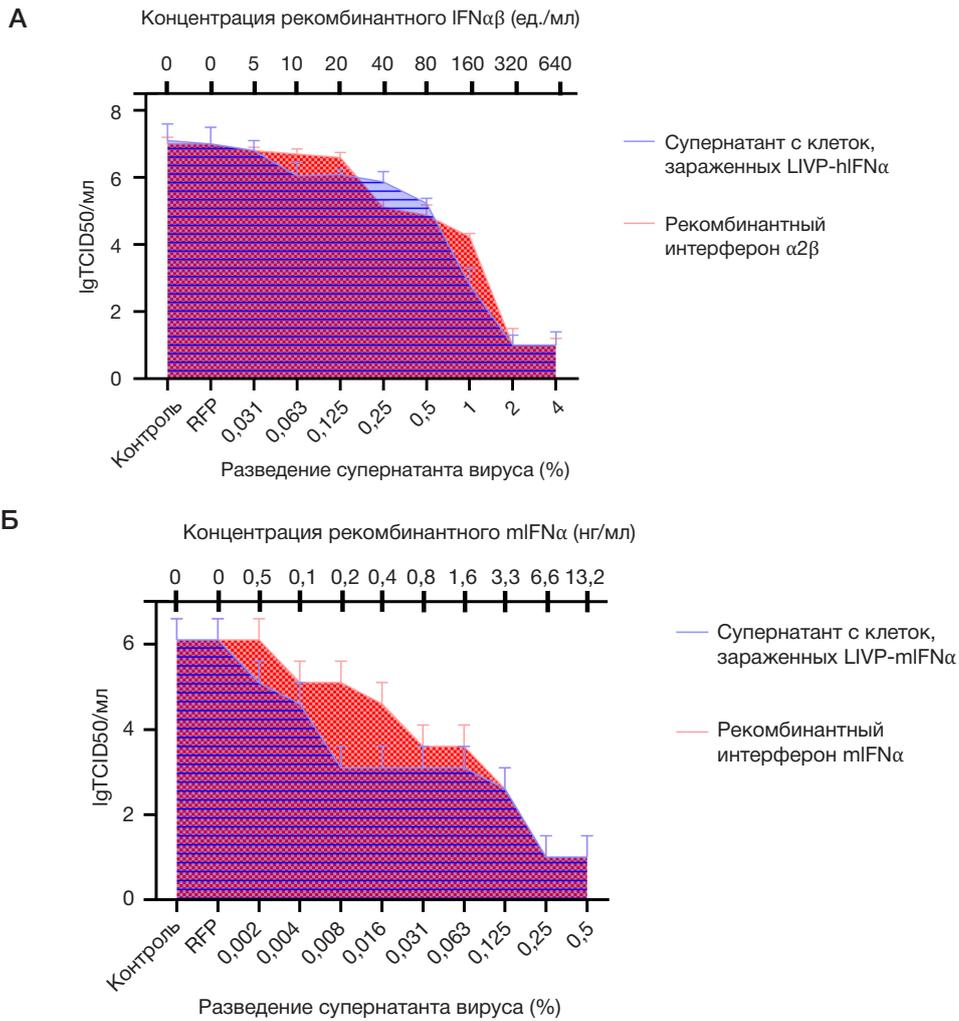


Рис. 5. Оценка функциональной активности интерферонов, экспрессируемых штаммами L1VP-hIFN α на клеточной линии U87-MG (А) или L1VP-mIFN α на клеточной линии V16 (Б)

НК-клетками. Механизмы повышенной онколитической активности L1VP-mIFN α нуждаются в дополнительных исследованиях, но по данным литературы и нашим собственным данным в отношении других рекомбинантных штаммов [7, 10], содержащих последовательности цитокинов, можно предположить, что наблюдается повышенная активация NK-клеток и цитотоксических Т-клеток вокруг опухоли, секретирующей IFN α .

Выводы

Созданы новые рекомбинантные штаммы вируса осповакцины, экспрессирующие IFN α мыши и человека, характеризующиеся сопоставимой с материнским штаммом онколитической активностью, при этом для L1VP-hIFN α показана значимая онкоселективность за счет уменьшения чувствительности нормальных клеток

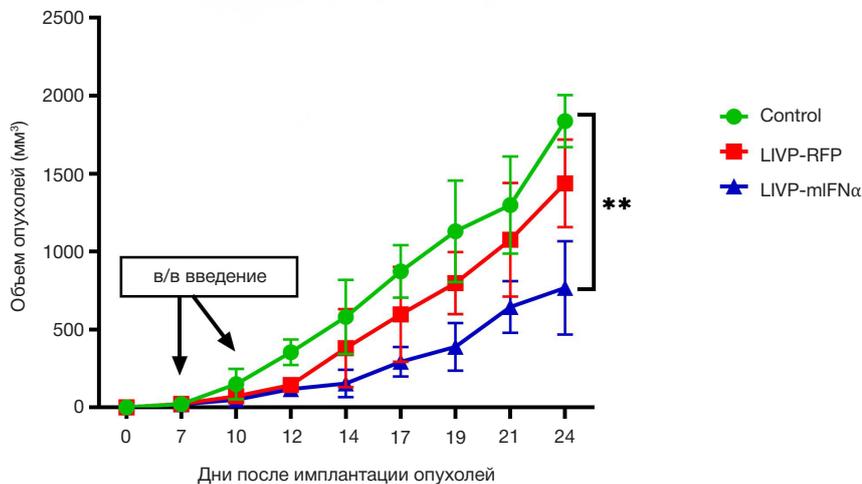


Рис. 6. Динамика роста опухолей после инъекции L1VP-mIFN α

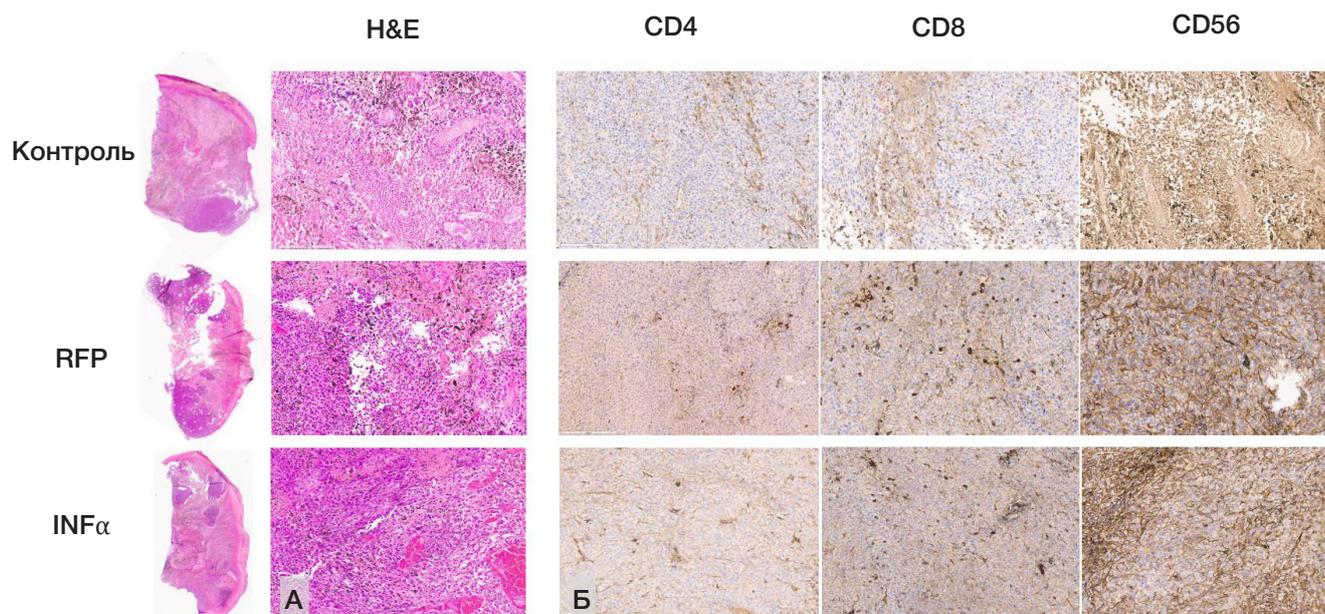


Рис. 7. Гистологическое и иммуногистохимическое исследование препаратов опухолей через 24 дня после инокуляции. **А.** Окрашивание гематоксилином и эозином (слева общий вид опухоли, справа фрагменты с увеличением $\times 200$). **Б.** Иммуногистохимическое окрашивание на кластеры дифференцировки: CD4, CD8, CD56. Сверху вниз показаны репрезентативные препараты животных из контрольной группы, группы с LVP-RFP и группы LVP-mIFN α соответственно

к этому вирусу. В экспериментах *in vitro* подтверждена функциональная активность интерферонов, экспрессируемых рекомбинантными штаммами LVP-hIFN α и LVP-mIFN α .

Продемонстрирована достоверно более высокая онколитическая активность LVP-mIFN α *in vivo* на модели мышинной меланомы B16.

Литература

- Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016; 107 (10): 1373–9.
- Shakiba Y, et al., Recombinant Strains of Oncolytic Vaccinia Virus for Cancer Immunotherapy. *Biochemistry (Mosc).* 2023; 88 (6): 823–41.
- Shvalov AN, et al. Complete Genome Sequence of Vaccinia Virus Strain L-IVP. *Genome Announc.* 2016; 4 (3).
- Zonov E, et al. Features of the Antitumor Effect of Vaccinia Virus Lister Strain. *Viruses.* 2016; 8 (1).
- Hamad A, et al. Recent Developments in Glioblastoma Therapy: Oncolytic Viruses and Emerging Future Strategies. *Viruses.* 2023; 15 (2).
- Naik S, Russell SJ. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic therapy with recombinant vaccinia viruses targeting the interleukin-15 pathway elicits a synergistic response. *Mol Ther Oncolytics.* 2023; 29: 158–68.
- Kim DH, et al. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med.* 2007; 4 (12): e353.
- Park BH, et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 2008; 9 (6): 533–42.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic Efficacy of a Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Bacterial Flagellin in Solid Tumor Models. *Viruses.* 2023; 15 (4).
- Kochneva G, et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression. *Oncotarget.* 2014; 5 (22): 11269–82.
- Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther.* 2011; 22 (9): 1101–8.
- Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15 (4): 231–42.
- Gastl G, Huber C. The biology of interferon actions. *Blut.* 1988; 56 (5): 193–9.
- Matveeva OV, Chumakov PM. Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev Med Virol.* 2018; 28 (6): e2008.
- Pikor LA, Bell JC, Diallo JS. Oncolytic Viruses: Exploiting Cancer's Deal with the Devil. *Trends Cancer.* 2015; 1 (4): 266–77.
- Stojdl DF, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* 2000; 6 (7): 821–5.
- Feola S, et al. Oncolytic ImmunoViroTherapy: A long history of crosstalk between viruses and immune system for cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 2022; 236: 108103.
- Li R, et al. Using oncolytic viruses to ignite the tumour immune microenvironment in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2021; 18 (9): 543–55.
- Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14 (9): 642–62.
- Davola ME, Mossman KL. Oncolytic viruses: how "lytic" must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology.* 2019; 8 (6): e1581528.
- Kim DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (1): 64–71.
- Vorobyev PO, et al. Comparative Efficiency of Accessible Transfection Methods in Model Cell Lines for Biotechnological Applications. *Bulletin of RSMU.* 2022; 3: 11–18.
- Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7 (45): 74171–88.
- Lin AH, et al. Blockade of type I interferon (IFN) production by retroviral replicating vectors and reduced tumor cell responses to IFN likely contribute to tumor selectivity. *J Virol.* 2014; 88 (17): 10066–77.
- Samson A, et al. Neoadjuvant Intravenous Oncolytic Vaccinia

- Virus Therapy Promotes Anticancer Immunity in Patients. *Cancer Immunol Res.* 2022; 10 (6): 745–56.
27. Vasileva N, et al. The Recombinant Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact and Chemotherapy Drugs against Human Glioma. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (8).
28. Shakiba Y, et al. Comparison of the oncolytic activity of recombinant vaccinia virus strains LIVP-RFP and MVA-RFP against solid tumors. *Bulletin of RSMU.* 2023; 2: 4–11.

References

- Fukuhara H, Ino Y, Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016; 107 (10): 1373–9.
- Shakiba Y, et al., Recombinant Strains of Oncolytic Vaccinia Virus for Cancer Immunotherapy. *Biochemistry (Mosc).* 2023; 88 (6): 823–41.
- Shvalov AN, et al. Complete Genome Sequence of Vaccinia Virus Strain L-IVP. *Genome Announc.* 2016; 4 (3).
- Zonov E, et al. Features of the Antitumor Effect of Vaccinia Virus Lister Strain. *Viruses.* 2016; 8 (1).
- Hamad A, et al. Recent Developments in Glioblastoma Therapy: Oncolytic Viruses and Emerging Future Strategies. *Viruses.* 2023; 15 (2).
- Naik S, Russell SJ. Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (9): 1163–76.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic therapy with recombinant vaccinia viruses targeting the interleukin-15 pathway elicits a synergistic response. *Mol Ther Oncolytics.* 2023; 29: 158–68.
- Kirn DH, et al. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med.* 2007; 4 (12): e353.
- Park BH, et al. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 2008; 9 (6): 533–42.
- Shakiba Y, et al. Oncolytic Efficacy of a Recombinant Vaccinia Virus Strain Expressing Bacterial Flagellin in Solid Tumor Models. *Viruses.* 2023; 15 (4).
- Kochneva G, et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression. *Oncotarget.* 2014; 5 (22): 11269–82.
- Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin-angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther.* 2011; 22 (9): 1101–8.
- Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15 (4): 231–42.
- Gastl G, Huber C. The biology of interferon actions. *Blut.* 1988; 56 (5): 193–9.
- Matveeva OV, Chumakov PM. Defects in interferon pathways as potential biomarkers of sensitivity to oncolytic viruses. *Rev Med Virol.* 2018; 28 (6): e2008.
- Pikor LA, Bell JC, Diallo JS. Oncolytic Viruses: Exploiting Cancer's Deal with the Devil. *Trends Cancer.* 2015; 1 (4): 266–77.
- Stojdl DF, et al. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med.* 2000; 6 (7): 821–5.
- Feola S, et al. Oncolytic ImmunoViroTherapy: A long history of crosstalk between viruses and immune system for cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 2022; 236: 108103.
- Li R, et al. Using oncolytic viruses to ignite the tumour immune microenvironment in bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2021; 18 (9): 543–55.
- Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14 (9): 642–62.
- Davola ME, Mossman KL. Oncolytic viruses: how "lytic" must they be for therapeutic efficacy? *Oncoimmunology.* 2019; 8 (6): e1581528.
- Kirn DH, Thorne SH. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9 (1): 64–71.
- Vorobyev PO, et al. Comparative Efficiency of Accessible Transfection Methods in Model Cell Lines for Biotechnological Applications. *Bulletin of RSMU.* 2022; 3: 11–18.
- Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget.* 2016; 7 (45): 74171–88.
- Lin AH, et al. Blockade of type I interferon (IFN) production by retroviral replicating vectors and reduced tumor cell responses to IFN likely contribute to tumor selectivity. *J Virol.* 2014; 88 (17): 10066–77.
- Samson A, et al. Neoadjuvant Intravenous Oncolytic Vaccinia Virus Therapy Promotes Anticancer Immunity in Patients. *Cancer Immunol Res.* 2022; 10 (6): 745–56.
- Vasileva N, et al. The Recombinant Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact and Chemotherapy Drugs against Human Glioma. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (8).
- Shakiba Y, et al. Comparison of the oncolytic activity of recombinant vaccinia virus strains LIVP-RFP and MVA-RFP against solid tumors. *Bulletin of RSMU.* 2023; 2: 4–11.

ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛИ НА КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

А. А. Актанова^{1,2}✉, М. В. Быкова¹, И. П. Скачков^{1,2}, В. В. Денисова³, Е. А. Пашкина^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения, Новосибирск, Россия

³ Клиника иммунопатологии Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

На сегодняшний день существует теория о том, что пролиферативный потенциал гемопоэтических стволовых клеток истощается, а баланс коммитированных предшественников смещается в сторону супрессоров в ходе развития онкологии, однако дифференцировка гемопоэтических стволовых клеток может варьироваться в зависимости от типа, локализации и специфики микроокружения опухоли. Целью исследования было оценить влияние опухолей различного генеза на CD34⁺-гемопоэтические стволовые клетки ($n = 10$). С помощью метода проточной цитометрии проводили анализ клеточного цикла и дифференцировки клеток как через прямой контакт с опухолью, так и через обмен только гуморальными факторами в трансвеллах. В ко-культуре с K562 количество ГСК, находящихся в синтетической фазе, составило 2,1%, в контроле — 11,2% ($p = 0,01$); в ко-культуре с SK-mel37 количество клеток, находящихся в фазе G₂-M клеточного цикла, снижалось до 0,3% ($p < 0,05$). 1301 и K562 направляли дифференцировку ГСК в сторону гранулоцитарно-макрофагальных предшественников ($p < 0,05$), а 1301 и SK-mel37 в сторону общих мультипотентных предшественников. Интересно, что после инкубации с K562 в трансвеллах статистически значимо увеличивалось количество плюрипотентных гемопоэтических стволовых клеток в два раза по сравнению с контролем (24,17% и 10,19% соответственно). Таким образом, свойства гемопоэтических клеток могут меняться как от вида опухоли, так и от способа взаимодействия с ними.

Ключевые слова: гемопоэтическая стволовая клетка, дифференцировка клеток, коммитированные предшественники, пролиферация, проточная цитометрия, Т-клеточный лейкоз, хроническая миелогенная лейкемия, меланома

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 23–25-10099.

Вклад авторов: А. А. Актанова — дизайн исследования, выполнение экспериментальной части, анализ и интерпретация данных, подготовка, редактирование рукописи; М. В. Быкова — анализ литературы, интерпретация данных, редактирование текста; И. П. Скачков — пробоподготовка, работа с иллюстрациями, В. В. Денисова — предоставление материала исследования, консультирование, Е. А. Пашкина — планирование, разработка и редактирование дизайна исследования, анализ данных, редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 145 от 19 апреля 2024 г.). Все условно здоровые доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алина Александровна Актанова
ул. Ядринцевская, д. 14, г. Новосибирск, 630099, Россия; aktanova_al@mail.ru

Статья получена: 02.12.2024 **Статья принята к печати:** 16.12.2024 **Опубликована онлайн:** 27.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.065

IMPACT OF TUMOR ON THE CELL CYCLE AND DIFFERENTIATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Aktanova AA^{1,2}✉, Bykova MV¹, Skachkov IP^{1,2}, Denisova VV³, Pashkina EA^{1,2}

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

³ Immunopathology Clinic, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

Today, there is a theory that proliferative potential of hematopoietic stem cells is depleted, and the balance of committed precursor cells shifts towards suppressors during the development of cancer. However, differentiation of hematopoietic stem cells can vary depending on the tumor type, localization, and microenvironment specifics. The study aimed to assess the impact of tumors of various origins on the CD34⁺ hematopoietic stem cells ($n = 10$). Assessment of the cell cycle and cell differentiation via both direct contact with the tumor and exchanging humoral factors only in transwells was conducted by flow cytometry. In the co-culture with K562, the number of hematopoietic stem cells being in their synthesis phase was 2.1%, while in the control it was 11.2% ($p = 0.01$); in the co-culture with SK-mel37, the number of hematopoietic stem cells being in the G₂-M cell cycle phase was reduced to 0.3% ($p < 0.05$). 1301 and K562 directed the hematopoietic stem cell differentiation towards granulocyte-macrophage precursor cells ($p < 0.05$), while 1301 and SK-mel37 directed it towards common multipotent progenitor cells. It is interesting that the number of pluripotent hematopoietic stem cells significantly increased (2-fold) compared to control after incubation with K562 in transwells (24.17% and 10.19%, respectively). Thus, properties of hematopoietic stem cells can vary depending on both tumor type and the way of interacting with these cells.

Keywords: hematopoietic stem cell, cell differentiation, committed precursor cells, proliferation, flow cytometry, T-cell leukemia, chronic myelogenous leukemia, melanoma

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 23–25-10099.

Author contribution: Aktanova AA — study design, experimental procedure, data analysis and interpretation, manuscript writing and editing; Bykova MV — literature review, data interpretation, manuscript editing; Skachkov IP — sample preparation, handling illustrations; Denisova VV — providing the biomaterials for the study, advising; Pashkina EA — planning, developing and editing the study design, data analysis, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (protocol No. 145 dated 19 April 2024). All the conditionally healthy donors submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alina A. Aktanova
Yadrintsevskaya, 14, Novosibirsk, 630099, Russia; aktanova_al@mail.ru

Received: 02.12.2024 **Accepted:** 16.12.2024 **Published online:** 27.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.065

Известно, что важным компонентом ниши костного мозга являются гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), которые в результате созревания и дифференцировки формируют пул клеток крови на протяжении всей жизни. Ниша — особое микроокружение с гуморальными факторами и специфическими клеточными контактами для ГСК, обеспечивающими строго регулируемые процессы самоподдержания или самообновления и дифференцировки клеток. ГСК обладают уникальным клеточным циклом с асимметричным делением для поддержания и обновления пула плюрипотентных ГСК и, одновременно, для генерирования необходимых общих или более дифференцированных предшественников. Активность ГСК зависит напрямую от клеточного цикла, от его продолжительности или времени до входа в клеточный цикл, а также частоты клеточных делений. Важно, что в гомеостатических условиях большинство ГСК в значительной степени должны находиться в фазе G0 клеточного цикла или в фазе покоя (до 95%), чтобы предотвратить преждевременное истощение клеток, при этом самообновление клеток и дифференцировка наступают в фазу G2 [1]. Поскольку обычно ГСК находятся в условиях ниши в состоянии покоя, опосредованном внутри- и внеклеточными механизмами, включая некоторые ингибиторы пролиферации, например CXCL4 и TGF β , секретируемые мегакариоцитами [2], изменения в межклеточном контакте или концентрации, а также появлении новых гуморальных факторов способны вывести ГСК из состояния покоя, индуцировать их пролиферацию и дифференцировку, аналогичную пролиферации ГСК во время кровопотери, облучения или действия провоспалительных цитокинов [3]. В свою очередь, это приведет к снижению их функциональности, аберрантной регуляции клеточного цикла и даже злокачественности [4, 5]. Интересно, что деление клеток при этом не является обязательным этапом перед дифференцировкой в общие миелоидные, мегакариоцитарно-эритроидные и пре-мегакариоцитарные предшественники [6]. Наряду с данными предшественниками в гемопоэтическом процессе выделяют общие мультипотентные и лимфоидные предшественники. Каждую клетку можно отличить по маркерам дифференцировки, которые ГСК приобретает в процессе специализации и действия различных стимулов, в частности комбинации колониестимулирующих факторов. Классическим вариантом стимулов являются также цитокины, однако они могут оказывать негативное и позитивное влияние на дифференцировку. Так, индуцировать миелопоэз способны GM-CSF, G-CSF, M-CSF, EPO, TPO, SCF/KL, FL, TNF, LIF, IL12, IL11, IL6, IL5, IL4, IL3, IL1, SDF-1, FGF-4, а угнетать TNF, IL4, TGF β , IFN, MIP-1, IL10, IL13, и для активации лимфопоэза необходимы IL2, IL4, IL7, а угнетения — TGF β , IL4 [7]. В микроокружении опухоли, благодаря наличию большого количества опухоль-ассоциированных клеток, синтезируется широкий спектр факторов, который потенциально способен направлять дифференцировку ГСК в те или иные общие или более специализированные предшественники. Таким образом, при определенных условиях возможно расширение пула самих ГСК, предшественников ГСК и соответственно изменение их функциональной активности, которое может привести к развитию патологического процесса в организме или ухудшению течения имеющегося. Так, например, при опухолевом процессе формируется специфическое микроокружение, в котором по последним данным гемопоэтические стволовые клетки

играют немаловажную роль. Известно, что опухоль способна рекрутировать клетки в процессе онкогенеза, ГСК не являются исключением, при этом все клетки, произошедшие из ГСК в микроокружении солидных опухолей, участвуют в процессах опухолевой инвазии, ее росте, прогрессировании и химиорезистентности к препаратам [8]. Нередко ГСК или так называемые опухоль-ассоциированные ГСК являются опухоль иницирующими клетками и в процессе могут вызывать дифференцировку других клеток в фибробласты, макрофаги и эндотелиальные клетки, которые поддерживают рост и рецидив опухоли посредством продукции и секреции факторов роста и компонентов внеклеточного матрикса в дополнение к запуску процесса ангиогенеза [9]. Таким образом, наряду с другими опухоль-ассоциированными клетками, гемопоэтическая стволовая клетка принимает активное участие в поддержании и прогрессировании опухолевого процесса, однако на сегодняшний день аспекты взаимодействия гемопоэтических стволовых клеток и опухолевых остаются малоизученными. Поэтому необходимо исследовать влияние не только межклеточного контакта, но и гуморальных факторов опухоли на ключевые этапы жизнедеятельности ГСК, такие как пролиферативная способность, клеточный цикл и дифференцировка, что и явилось целью нашего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

CD34⁺-сепарированные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) доноров ($n = 10$, средний возраст — $38,1 \pm 3,4$ года) были получены в Клинике иммунопатологии НИИФКИ. В исследовании в качестве материала использовали также клеточную линию человеческого Т-клеточного лейкоза 1301, клеточную линию человеческого хронического миелоидного лейкоза K562 (Европейская коллекция аутентифицированных клеточных культур, Sigma Aldrich, Merck KGaA, Германия) и клеточную линию человеческой меланомы Sk-mel-37, любезно предоставленную Лабораторией клеточных технологий НИИФКИ (Новосибирск, Россия).

Культивирование ГСК

Процедуру размораживания и промывания криоконсервированных CD34-положительных образцов ГСК проводили в соответствии со стандартными рекомендациями для замороженных первичных клеток [10, 11]. HSC подсчитывали в 0,01%-м (10 мг/мл) растворе метиленового синего («Биолот», Россия) для определения жизнеспособности клеток с использованием камеры Горяева. Полученные клетки культивировали в различных количествах (от 100 000 до 1 000 000 кл./мл) с соответствующей средой RPMI-1640 («Панэко», Россия) или средой для размножения гемопоэтических стволовых клеток Stemline II (STEM) (Sigma Aldrich Co. LLC, США) в качестве положительного контроля, дополненных 50 мг/мл гентамицина (Dalfarma, Россия), 25 мг/мл тиенама (Merck Sharp & Dohme Corp., Кенилворт, Нью-Джерси, США) в течение различного времени в зависимости от серии экспериментов при 37 °C, 5% CO₂ и увлажненной атмосфере.

Культивирование линий опухолевых клеток

Суспензионные линии опухолевых клеток K562 и 1301 и адгезионную линию SK-mel37 культивировали в стандартных

условиях с использованием полной культуральной среды RPMI-1640 + 2 мМ глутамин + 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США). Культуры поддерживали в диапазоне от 100 000 до 1 000 000 кл./мл, при 5% CO₂ и 37 °С. Кондиционные среды отбирали с расчетом на серию экспериментальные среды экспоненциальную фазу роста опухолевых линий и замораживали для дальнейшего использования.

Жизнеспособность и пролиферация ГСК

ГСК в количестве 1×10^5 кл./250 мл инкубировали с кондиционными средами опухолевых линий от 1301, K562, SK-mel 37 в различных разведениях 100%, 50%, 10% с дополнением до установленного объема полной культуральной средой RPMI-60 с 10%-м человеческим альбумином (Октафарма Фармацевтика Продуктионсгес м.б.Х., Австрия) в плоскостном 96-луночном планшете (TPP, Швейцария) в триплетах в течение 3, 5 и 7 дней. В качестве положительного контроля использовали специализированную клеточную среду STEM. В качестве отрицательного контроля — DMSO. Условия культивирования ГСК были стандартными: при 37 °С, 5% CO₂, 90% относительной влажности.

Также ГСК в количестве 1×10^5 кл./250 мл инкубировали с опухолевыми линиями в специальных планшетах для полного исключения клеточного контакта — в 12-луночных трансвеллах с размером пор 0,4 мкм, диаметром вставки 6,5 мм (Corning Incorporated, Costar, Аризона, США) в течение трех дней в тех же условиях.

Жизнеспособность и пролиферативную активность ГСК оценивали при помощи реагента WST-1 (Takara Bio Inc., Кусацу, Япония). Анализ образцов проводили колориметрически с помощью микропланшетного ридера Tecan Infinite F50 (Австрия) с длиной волны 450 нм (эталон 650 нм).

Клеточный цикл ГСК

Предварительно ГСК окрашивали CFSE-красителем (Invitrogen, Юджин, Орегон, США) согласно протоколу производителя для отличия их от опухолевых клеток в культуре в планшете.

ГСК в соотношении 1 : 1 — 1×10^5 кл./мл и 10 : 1 — 1×10^6 кл./мл к опухолевым клеткам инкубировали в 24-луночном планшете как ко-культуру для оценки влияния прямого контакта опухолевых клеток на стволовые и в 12-луночных трансвеллах для оценки влияния только гуморальных факторов в течение трех суток в тех же условиях, в качестве контроля использовали интактные клетки в средах RPMI и STEM. Затем клетки переносили в цитометрические пробирки и фиксировали в ледяном 70% спирте на льду в течение 2 ч, трижды отмывали, потом добавляли красящий раствор на основе EtBr (Serva Electrophoresis GmbH, Гейдельберг, Германия) 1 мг/мл, RNAазу А («Микроген», Россия) 5 мкг/мл, 10% фетальной бычьей сыворотки и PBS + ЭДТА, окрашивали в течение 30 мин при температуре 37 °С. Готовые образцы анализировали с помощью 14-цветного проточного цитофлуориметра LongCyte (Challenbio, Китай) с программным обеспечением ModelFlower.

Дифференцировка ГСК

ГСК в соотношении 10 : 1 — 1×10^6 кл./мл к опухолевым клеткам (поскольку для оценки коммитированных

предшественников необходимо большее количество клеток) инкубировали в 24-луночном планшете как ко-культуру и в 12-луночных трансвеллах в тех же условиях. Затем клетки переносили в цитометрические пробирки и окрашивали с помощью моноклональных антител к CD10 PE (BioLegend, США), CD34 APC (BioLegend, США), CD38 PE-Cy7 (ElabScience, Китай), CD45RA PerCP (ElabScience, Китай), CD90 APC-Cy7 (Cloud-Clone Corp., США), Lin- (коктейль CD3/14/16/19/20/56) FITC (BioLegend, США). Опытные образцы анализировали с помощью 14-цветного проточного цитофлуориметра LongCyte (Challenbio, Китай) с программным обеспечением ModelFlower. При оценке флуоресценции для каждого моноклонального антитела был выполнен Fluorescent minus one контроль (FMO). Клетки предшественники типировали по поверхностным маркерам следующим образом: плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки (пГСК) Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺; общие мультипотентные предшественники (оМПП) Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻; общие предшественники лимфоцитов (ОЛП) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD90⁻; миелоидные и мегакариоцитарно-эритроидные предшественники (Э-МП) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁻CD10⁻; гранулоцитарно-моноцитарно-предшественники (Г-МП) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD10⁻; предшественники В- и NK-клеток (В-NK-П) Lin⁻CD34⁺CD38⁺CD45RA⁺CD10⁺. Также относительное количество предшественников оценивали до посадки в культуру в качестве контроля дифференцировки («до»).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.0. Тест Фридмана использовали для оценки различий между группами, где значение $p < 0,05$ считали статистически значимым. Данные были представлены как медиана (25-й перцентиль; 75-й перцентиль) ± межквартильный размах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первым шагом мы оценили жизнеспособность и пролиферативную активность стволовых гемопоэтических клеток в трех временных точках с разной долей гуморальных факторов от опухолевых линий различного генеза. Так, мы продемонстрировали, что в кондиционных средах с различной концентрацией от опухолевых линий поддерживалась жизнеспособность ГСК на уровне контроля на 3-и сутки. На 5-е сутки сохранялась не только жизнеспособность, но и началась пролиферация во всех разведениях кондиционных сред, на 7-е сутки поддерживался примерно тот же уровень пролиферации (рис. 1). При этом на 3-и и 5-е сутки жизнеспособность ГСК была выше в 50%-й и 100%-й кондиционной среде от SK-mel37 (рис. 1А, Б), однако на 7-е сутки резко снизилась их жизнеспособность (рис. 1В). Возможно, это связано с тем, что ГСК активнее пролиферировали в кондиционной среде от SK-mel37, и к 7-м суткам, предположительно, из-за отсутствия питательных веществ клетки начали погибать.

В пользу важности гуморального влияния на свойства ГСК говорят и результаты, полученные при культивировании ГСК с опухолевыми линиями в условиях, исключающих клеточный контакт, так на уровне достоверных различий, было установлено, что пролиферативная активность ГСК была выше в трансвеллах, чем в контроле при одинаковом количестве клеток (рис. 2Б). Обращает на себя внимание и то, что SK-mel 37 обладает более высокой пролиферативной способностью в трансвеллах с ГСК по

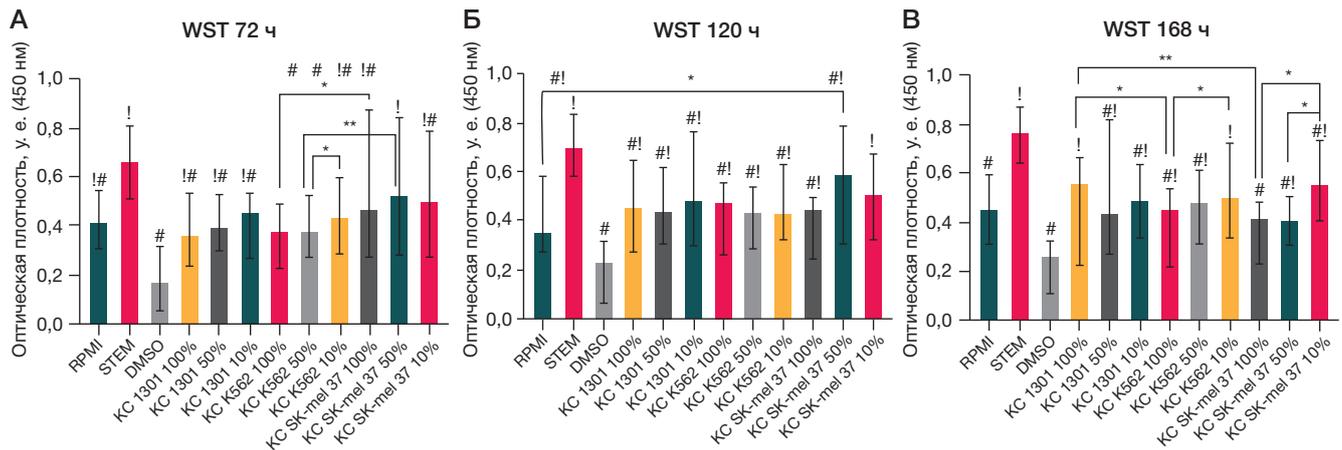


Рис. 1. Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности гемопоэтических стволовых клеток при сокультивации с кондиционными средами от опухолевых линий 1301, K562 и SK-mel в 10%, 50% и 100% разведении в течение 72 (А), 120 (Б) и 168 (В) часов (WST). Критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; # — достоверные различия по сравнению с контролем STEM; ! — достоверные различия по сравнению с контролем DMSO. * — достоверные различия, $p < 0,05$; ** — достоверные различия, $p < 0,005$

сравнению с линией 1301 в эквивалентных количествах (рис. 2А).

Далее мы оценили влияние сокультивирования на фазы клеточного цикла ГСК, так количество клеток, находящихся в фазе G2-M, было выше в сокультуре с SK-mel37 по сравнению с другими опухолевыми линиями. Большое количество клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, наблюдалось при клеточном контакте с 1301. Мы также продемонстрировали резкое снижение количества ГСК, культивируемое в трансвеллах с SK-mel37, это связано с гибелью клеток, поскольку 89,4% клеток находятся в фазе Sub-G1 (таблица), интересно, что и в кондиционных средах от SK-mel жизнеспособность и пролиферативная активность ГСК также снижалась, однако к 7 суткам.

На заключительном этапе при оценке дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток мы обнаружили, что соотношение предшественников было различным, так через трое суток увеличилось количество ГСК и общих мультипотентных предшественников (рис. 3А), при этом в большей степени увеличилось количество последних (рис. 3В), а вот количество общих лимфоидных,

мегакариоцитарных, эритроидных и миелоидных предшественников, наоборот, снизилось (рис. 3Б). Интересно, что при этом количество ГСК и МПП было достоверно ниже на 20,3% в трансвеллах с K562 по сравнению с другими опухолями в трансвеллах (рис. 3А), а значение плюрипотентных гемопоэтических клеток с фенотипом Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻ было выше по сравнению не только с другими опухолями в тех же условиях, но и контрольными образцами (рис. 4). Примечательно, что большее относительное количество гранулоцитарно-моноцитарных предшественников наблюдалось в ко-культуре с 1301 и K562, по сравнению с культурами в трансвеллах с теми же опухолями и контрольной средой (рис. 4). Количество общих предшественников тромбоцитов, эритроцитов и клеток миелоидного ряда снижалось при культивировании с клетками меланомы SK-mel-37 в условиях как прямого клеточного контакта, так и при обмене гуморальными факторами, при этом достоверной разницы между трансвеллами и ко-культурой в планшете получено не было (рис. 4).

Таким образом, под действием гуморальных факторов опухоли K562 относительное количество плюрипотентных

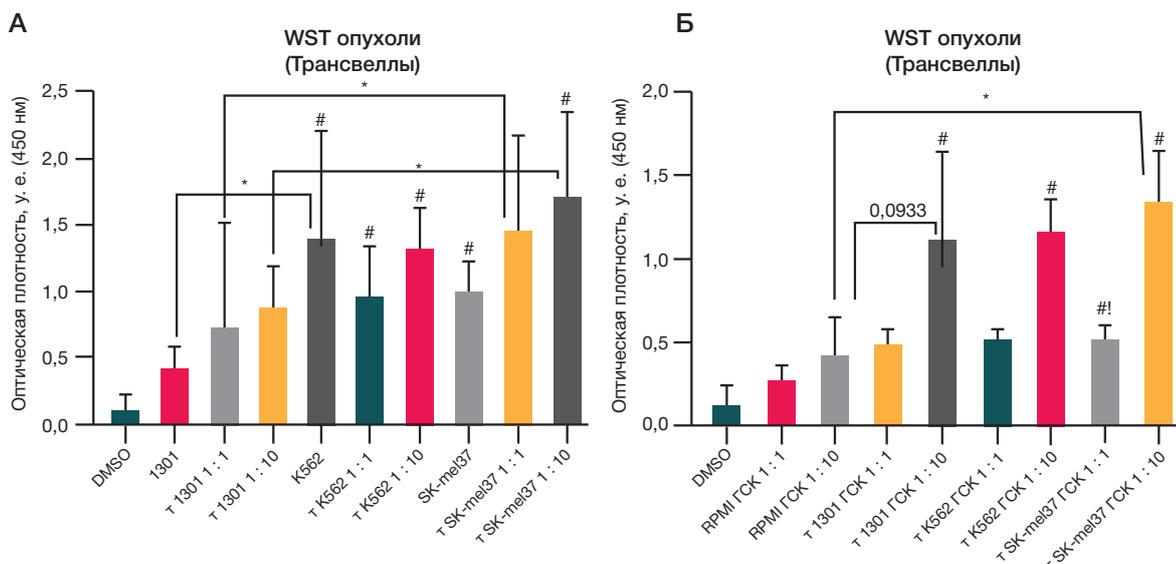


Рис. 2. Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности опухолевых клеток линий 1301, K562 и SK-mel37 (А) и гемопоэтических стволовых (Б) и при сокультивации в трансвеллах (т) в течение 72 ч. Критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; # — достоверные различия по сравнению с контролем DMSO; ! — тенденция по сравнению с SK-mel 37 ГСК 1:10, $p = 0,05$; * — достоверные различия, $p < 0,05$

Таблица. Относительное количество гемопоэтических стволовых клеток в разных фазах клеточного цикла при сокультивации с опухолевыми линиями 1301, K562 и SK-mel37 в ко-культуре (к-к) и в трансвеллах (т) в течение 72 ч

	G2/M	S	G0-G1	Sub-G1
RPMI 1/1	3,1 (0,2-6,7)	8,6 (3,6-25,7)	77,4 (63,9-86,9)	3,5 (0,9-4,7)
RPMI 1/10	0,5 (0,4-1,9)	11,2 (5,1-13,9)	82,6 (74,1-87,0)	1,3 (1,1-4,3)
к-к 1301 1/1	15,7 (8,3-21,9)	3,9 (1,1-11,2)	76,8 (65,6-81,0)	5,1 (0,2-7,5)
к-к 1301 1/10	11,5 (3,0-20,9)	13,0 (5,9-31,3)#	79,6 (63,6-95,4)	2,2 (0,5-3,5)
т 1301 1/1	3,0 (2,5-9,2)!	3,8 (2,2-24,1)	77,5 (69,1-88,9)	4,4 (0,8-6,8)
т 1301 1/10	3,2 (1,3-5,8)!	7,2 (1,9-11,3)	86,9 (84,5-93,3)	1,3 (0,5-2,3)!!
к-к K562 1/1	10,1 (0,4-27,2)	5,8 (1,8-32,1)	72,9 (59,1-83,5)	7,9 (3,7-12,6)
к-к K562 1/10	4,4 (1,3-7,3)	2,1 (1,4-3,8)**	83,9 (78,7-91,9)**	4,6 (1,9-6,6)
т K562 1/1	1,2 (0,4-4,4)	6,6 (3,5-22,6)	81,9 (72,9-88,7)	3,2 (0,9-5,6)
т K562 1/10	1,9 (1,2-16,6)	6,5 (3,6-7,6)	84,5 (72,7-89,6)	2,9 (1,1-3,6)
к-к SK-mel37 1/1	0,3 (0,1-0,6)*	7,2 (4,3-19,4)	71,9 (66,6-93,6)	6,8 (1,7-14,9)
к-к SK-mel37 1/10	1,0 (0,2-2,8)	12,5 (4,9-16,8)	86,1 (53,4-87,9)	3,8 (0,5-5,8)
т SK-mel37 1/1	1,6 (0,6-14,8)	6,4 (3,1-28,5)	78,9 (76,6-89,1)	1,2 (0,6-4,4)
т SK-mel37 1/10	0,5 (0,3-6,0)	4,7 (2,0-12,0)	1,6 (0-6,61)\$	89,4 (84,9-91,8)***

Примечание: критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$; * — достоверные различия по сравнению с к-к K562 1/1, к-к 1301 1/1; ** — достоверные различия по сравнению с к-к 1301 1/10, к-к SK-mel37 1/10, RPMI 1/10; *** — достоверные различия по сравнению с т SK-mel37 1/1, к-к SK-mel37 1/10, т K562 1/10, т 1301 1/10, RPMI 1/10; ! — достоверные различия по сравнению с контролем RPMI в эквивалентных концентрациях; !! — достоверные различия по сравнению с т 1301 1/1; # — тенденция, $p = 0,05$ по сравнению с к-к 1301 1/1, т 1301 1/10; \$ — достоверные различия по сравнению с т SK-mel37 1/1, к-к SK-mel37 1/10, т K562 1/10, т 1301 1/10, RPMI 1/10

ГСК увеличивалось, при клеточном контакте ГСК с K562 и с 1301 увеличивалось количество предшественников гранулоцитарно-моноцитарного ряда.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микроокружение опухоли — сложная, динамичная структура, являющаяся регулятором онкогенеза. Проблема изучения микроокружения опухоли в экспериментальных моделях остается актуальной на сегодняшний день. Можно выделить две основные составляющие микроокружения опухоли — синтез и обмен гуморальными факторами, а также образование перекрестных связей между клетками в условиях «клеточного соседства». Под влиянием опухоли клетки способны изменять свои свойства и функции. Известно о специфических клетках с собственным функционалом в микроокружении опухоли, это так называемые опухоль-ассоциированные макрофаги, фибробласты, дендритные клетки и другие [12–14], участвующие в процессе онкогенеза. Эти клетки на сегодняшний день могут быть рассмотрены и как

информативный маркер, и как терапевтическая мишень. Поскольку мы говорили о том, что в микроокружении опухоли обнаруживаются гемопоэтические стволовые клетки, немаловажным было оценить влияние опухоли на свойства ГСК.

По нашим данным, дифференцировка ГСК в культуре наступала на 3-и сутки, когда к 3-м суткам клетки активировались и начинали пролиферировать, а к 7-м суткам начинали дифференцироваться. Примечательно то, что ГСК способны вступать в раннюю дифференцировку на 3-и сутки под влиянием различных факторов [15]. В целом, количество клеток и дифференцировка ГСК зависят от того, взаимодействует она с опухолевой клеткой напрямую или опосредованно через гуморальные факторы. Общий паттерн в дифференцировке ГСК наблюдался у 1301 и K562, скорее всего, потому что оба типа опухоли являются по происхождению клонами гемопоэтических клеток, также следует отметить, что сдвиг в сторону гранулоцитарно-моноцитарного ряда связан с высоким риском метастазирования [16], что в целом характерно для лейкозов. Между тем ГСК

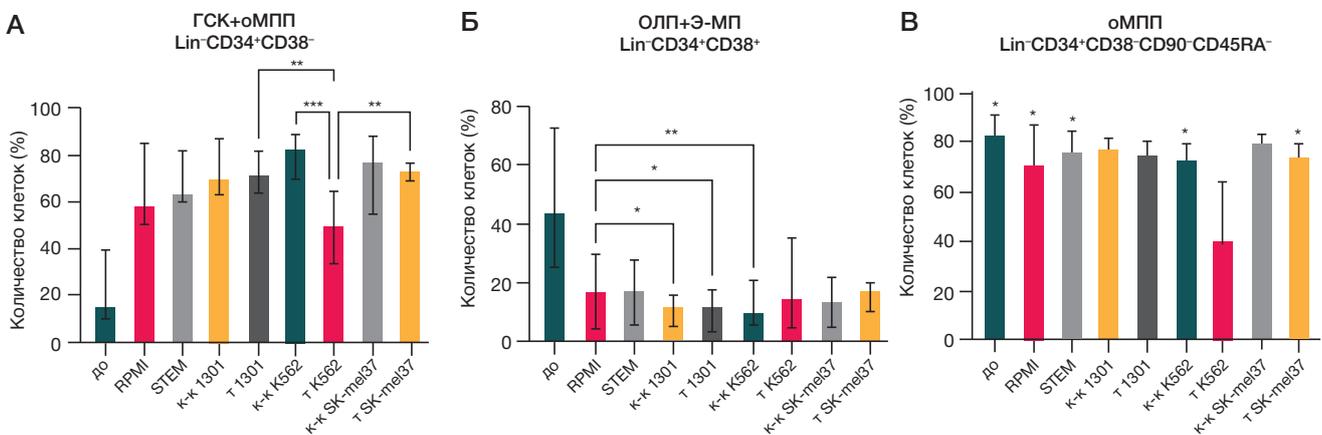


Рис. 3. Относительное количество общих предшественников гемопоэтических стволовых клеток при сокультивации с опухолевыми линиями 1301, K562 и SK-mel37 в ко-культуре (к-к) и в трансвеллах (т) в течение 72 ч. Критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха. * — достоверные различия по сравнению с т K562, $p < 0,05$

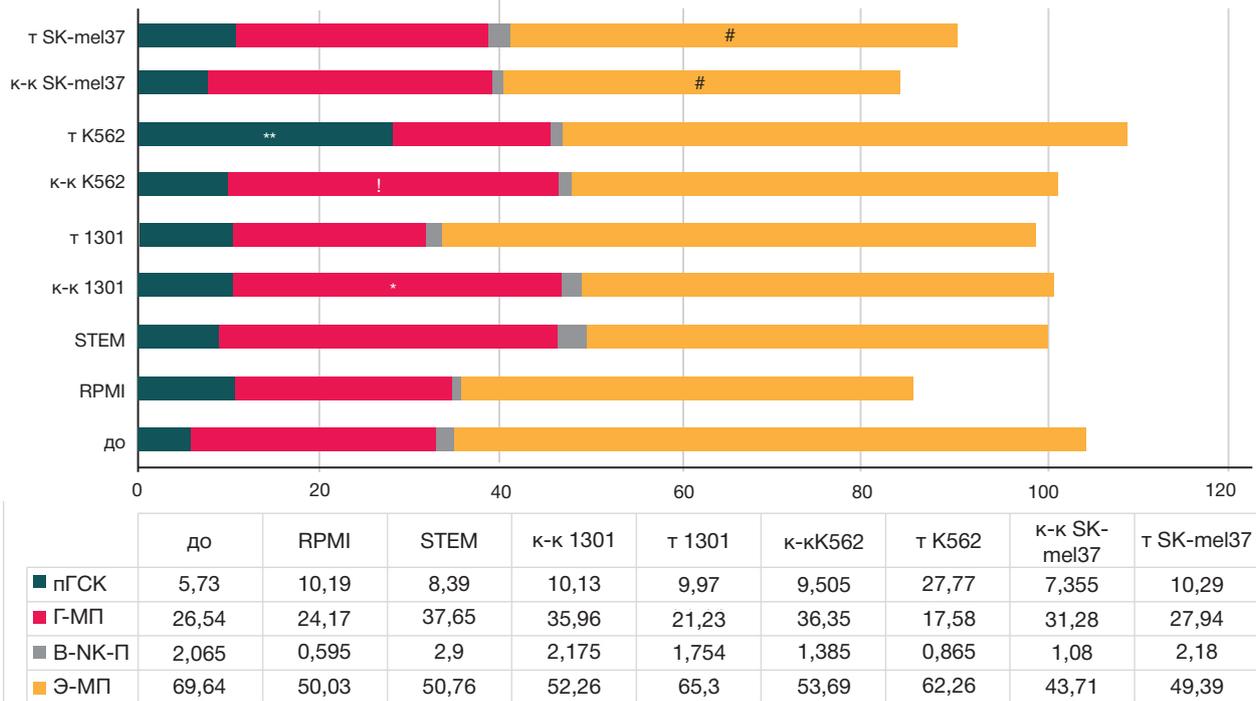


Рис. 4. Относительное количество предшественников гемопоэтических стволовых клеток при сокультивации с опухолевыми линиями 1301, K562 и SK-mel37 в ко-культуре (к-к) и в трансвеллах (т) в течение 72 ч. Критерий Фридмана, достоверные различия $p < 0,05$, данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; * — достоверные различия по сравнению с контролем RPMI, т K562; ** — достоверные различия по сравнению со всеми опытными группами, $p < 0,005$; ! — тенденция по сравнению с т K562, $p = 0,06$; # — тенденция по сравнению с контролем до и RPMI, $p = 0,05$

при культивации с солидной опухолью меланомой имели несколько отличающееся соотношение клеток со снижением общих предшественников миелопоэза и увеличением мультипотентных предшественников ($p = 0,05$). Интересно, что, согласно литературным источникам, дифференцировка ГСК направляется не только в сторону клеток миелоидного ряда при солидных опухолях, в частности миелоидных супрессоров [17], но и в сторону менее дифференцированных клеток с сохранением мультипотентности [18], что согласуется с нашими данными.

ВЫВОДЫ

В зависимости от типа опухоли меняются пролиферативная активность, деление клеток и дифференцировка.

Опухолевые линии лейкозов K562 и 1301 аналогично влияют на жизнеспособность и дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток, тогда как солидная опухоль — меланома SK-mel-37 оказывает другой эффект на те же процессы, что говорит нам как о частных, так и об общих закономерностях влияния опухолей на жизнедеятельность гемопоэтической стволовой клетки. Для более полного понимания влияния опухоли на свойства ГСК необходимо использовать более комплексный подход, включающий изучение секрета клеток, маркеров рекрутинга и ассоциированности с опухолевым процессом, а также использовать более сложные и релевантные методы сокультивирования клеток, учитывающие сложную, динамичную и гетерогенную структуру опухолевого микроокружения.

Литература

- Treichel S, Filippi M-D. Linking cell cycle to hematopoietic stem cell fate decisions. *Front Cell Dev Biol.* 2020; 11:1231735. DOI: 10.3389/fcell.2023.1231735.
- Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 10; 29 (2): 191–204. DOI: 10.1089/ars.2017.7419.
- Baldrige MT, King KY, Goodell M.A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends in Immunology.* 2011; 32 (2), 57–65. DOI: 10.1016/j.it.2010.12.003.
- Chavez JSPU, Loeffler D, Higa KC, Hernandez G, Mills TS. PU.1 enforces quiescence and limits hematopoietic stem cell expansion during inflammatory stress. *Exp Med.* 2011; 218 (6), e20201169. DOI: 10.1084/jem.20201169.
- Pietras EM, Warr MR, Passegué E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Cell Biol.* 2011; 195 (5): 709–20. DOI: 10.1083/jcb.201102131.
- Grinenko T, Eugster A, Thielecke L, et al. Hematopoietic stem cells can differentiate into restricted myeloid progenitors before cell division in mice. *Nat Commun.* 2018; 9, 1898. DOI: 10.1038/s41467-018-04188-7.
- Han W, Yu Y, Liu XY. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell Res.* 2006; 16: 189–95. DOI: 10.1038/sj.cr.7310026.
- Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun.* 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.
- Hassan G, Seno M. Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments. *Cells.* 2020; 9 (5): 1293. DOI: 10.3390/cells9051293.
- Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol.* 2007; 82 (6): 463–72. DOI: 10.1002/ajh.20707.
- Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 19: 283–7. DOI: 10.1038/sj.bmt.1700644.

12. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Discovery*. 2021; 4 (11): 933–59. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1808.
13. Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Research*. 2019; 18 (79): 4557–67. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
14. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, et al. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; 5 (234): 5700–21. DOI: 10.1002/jcp.27425.
15. Edel MJ, Menchon C, Vaquero JM, et al. A protocol to assess cell cycle and apoptosis in human and mouse pluripotent cells. *Cell Commun Signal*. 2011; 9 (8): DOI: 10.1186/1478-811X-9-8.
16. Magidey-Klein K, Kveler K, Cooper TJ, Normand R, Zhang T, Timaner M, Raviv Z, et al. Tumor-educated uncommitted hematopoietic stem cells promote a metastatic switch *BioRxiv*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.266189>.
17. Wang X, Li Y. The disruption of hematopoiesis in tumor progression. *BloodSci*. 2019; 1 (1): 88–91. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000001.
18. Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun*. 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.

References

1. Treichel S, Filippi M-D. Linking cell cycle to hematopoietic stem cell fate decisions. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 11:1231735. DOI: 10.3389/fcell.2023.1231735.
2. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal*. 2018; 10; 29 (2): 191–204. DOI: 10.1089/ars.2017.7419.
3. Baldrige MT, King KY, Goodell M.A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends in Immunology*. 2011; 32 (2), 57–65. DOI: 10.1016/j.it.2010.12.003.
4. Chavez JSPU, Loeffler D, Higa KC, Hernandez G, Mills TS. PU.1 enforces quiescence and limits hematopoietic stem cell expansion during inflammatory stress. *Exp Med*. 2011; 218 (6), e20201169. DOI: 10.1084/jem.20201169.
5. Pietras EM, Warr MR, Passequé E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Cell Biol*. 2011; 195 (5): 709–20. DOI: 10.1083/jcb.201102131.
6. Grinenko T, Eugster A, Thielecke L, et al. Hematopoietic stem cells can differentiate into restricted myeloid progenitors before cell division in mice. *Nat Commun*. 2018; 9, 1898. DOI: 10.1038/s41467-018-04188-7.
7. Han W, Yu Y, Liu XY. Local signals in stem cell-based bone marrow regeneration. *Cell Res*. 2006; 16: 189–95. DOI: 10.1038/sj.cr.7310026.
8. Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun*. 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.
9. Hassan G, Seno M. Blood and Cancer: Cancer Stem Cells as Origin of Hematopoietic Cells in Solid Tumor Microenvironments. *Cells*. 2020; 9 (5): 1293. DOI: 10.3390/cells9051293.
10. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol*. 2007; 82 (6): 463–72. DOI: 10.1002/ajh.20707.
11. Katayama Y, Yano T, Bessho A, et al. The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 19: 283–7. DOI: 10.1038/sj.bmt.1700644.
12. Bejarano L, Jordão MJC, Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Discovery*. 2021; 4 (11): 933–59. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1808.
13. Hinshaw DC, Shevde LA. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Research*. 2019; 18 (79): 4557–67. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
14. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, et al. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; 5 (234): 5700–21. DOI: 10.1002/jcp.27425.
15. Edel MJ, Menchon C, Vaquero JM, et al. A protocol to assess cell cycle and apoptosis in human and mouse pluripotent cells. *Cell Commun Signal*. 2011; 9 (8): DOI: 10.1186/1478-811X-9-8.
16. Magidey-Klein K, Kveler K, Cooper TJ, Normand R, Zhang T, Timaner M, Raviv Z, et al. Tumor-educated uncommitted hematopoietic stem cells promote a metastatic switch *BioRxiv*. 2020; DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.266189>.
17. Wang X, Li Y. The disruption of hematopoiesis in tumor progression. *BloodSci*. 2019; 1 (1): 88–91. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000001.
18. Lu IN, Dobersalske C, Rauschenbach L, et al. Tumor-associated hematopoietic stem and progenitor cells positively linked to glioblastoma progression. *Nat Commun*. 2021; 12, 3895. DOI: 10.1038/s41467-021-23995-z.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МИКРОПРОБИРКИ — ПЕРСПЕКТИВНАЯ ОСНОВА ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ АНТИТЕЛ ИММУНОЗАХВАТА НА ПРИМЕРЕ SARS-COV-2

Е. О. Рубальский^{1,2}✉, Р. А. Абдрахманова¹, Г. Р. Баева¹, Т. С. Рубальская³, М. В. Лазько¹, С. В. Поройский¹, Д. В. Щебляков⁴, И. А. Фаворская⁴, В. А. Гушчин^{4,5,6}

¹ Астраханский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Астрахань, Россия

² Российский университет медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Иммунозахват антителами на твердой фазе является важным инструментом в иммунологических исследованиях, но традиционные полистироловые планшеты подвержены деформации при термоциклировании и перекрестной контаминации образцов, что снижает точность и воспроизводимость при включении в исследование молекулярно-генетических методов. Разработка альтернативных решений, таких как модифицированные полипропиленовые пробирки с полистироловым покрытием, позволяет устранить эти ограничения. Целью исследования было создать и оценить эффективность нового подхода к иммунозахвату SARS-CoV-2 с использованием модифицированных пробирок. Для анализа использовали моноклональные антитела P2C5 и R107, а также инактивированные штаммы ГК2020/1 (Ухань) и hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (Омикрон). Иммуобилизацию антител, сорбцию вирусных частиц и выделение РНК проводили с применением модифицированных пробирок, стандартных планшетов и пробирок без покрытия. Основные результаты показали, что модифицированные пробирки с полистироловым покрытием обеспечивали лучший иммунозахват по сравнению с планшетами ($p < 0,0001$), особенно при использовании антител P2C5, эффективных против различных генетических линий SARS-CoV-2, включая Омикрон. Антитела R107 продемонстрировали ограниченную специфичность, не превышающую уровень контрольной группы с бычьим сывороточным альбумином. Анализ перекрестной контаминации выявил ее наличие в 14 из 288 образцов в планшетах, тогда как в модифицированных пробирках контаминации образцов не было. Таким образом, использованные для высокоточных молекулярных исследований модифицированные пробирки имеют преимущества, так как обеспечивают снижение риска перекрестной контаминации и улучшение эффективности иммунозахвата.

Ключевые слова: иммунозахват, моноклональные антитела, ОТ-ПЦР, модифицированная поверхность, перекрестная контаминация, SARS-CoV-2

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-20035, <https://rscf.ru/project/23-15-20035/>

Вклад авторов: Е. О. Рубальский, Р. А. Абдрахманова, Г. Р. Баева, Т. С. Рубальская — экспериментальная часть с модифицированными микропробирками; Д. В. Щебляков, И. А. Фаворская — подготовка моноклональных антител; Е. О. Рубальский, М. В. Лазько, С. В. Поройский, В. А. Гушчин — дизайн исследования. Все авторы внесли равный вклад в поиск и анализ информации, подготовку проекта и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 22 февраля 2023 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Евгений Олегович Рубальский
ул. Бакинская, д. 121, г. Астрахань, 414000, Россия; e.o.rubalsky@gmail.com rubalsky@phage.pro

Статья получена: 29.11.2024 **Статья принята к печати:** 19.12.2024 **Опубликована онлайн:** 28.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.068

MODIFIED MICRO TEST TUBES AS A PROMISING BASIS FOR IMMOBILIZATION OF ANTIBODIES FOR IMMUNOCAPTURE ON THE EXAMPLE OF SARS-COV-2

Roubalsky EO^{1,2}✉, Abdrakhmanova RA¹, Baeva GR¹, Rubalskaya TS³, Lazko MV¹, Poroykiy SV¹, Shcheblyakov DV⁴, Favorskaya IA⁴, Gushchin VA^{4,5,6}

¹ Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

² Russian University of Medicine, Moscow, Russia

³ Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia

⁴ Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁶ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

The solid-phase immunocapture with antibodies is an important tool used in immunology studies, but conventional polystyrene plates are prone to deformation during thermal cycling and cross-contamination of samples, which reduces accuracy and reproducibility, when molecular genetic testing methods are included in the study. The development of alternative solutions, such as modified polystyrene-coated polypropylene tubes, makes it possible to eliminate these limitations. The study aimed to create a new approach to SARS-CoV-2 immunocapture involving the use of modified test tubes and to assess its efficacy. Monoclonal antibodies P2C5 and R107, as well as inactivated strains GK2020/1 (Wuhan) and hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (Omicron) were used for analysis. Immobilization of antibodies, sorption of viral particles, and RNA extraction were accomplished using modified test tubes, standard plates, and uncoated test tubes. The key findings showed that the polystyrene-coated modified test tubes ensured better immunocapture compared to the plates ($p < 0.0001$), especially when using the P2C5 antibody effective against various SARS-CoV-2 lineages, including Omicron. The R107 antibody showed limited specificity, not exceeding that of the control group with bovine serum albumin. The cross-contamination analysis revealed contamination of 14 samples out of 288 in the plates, while no contamination of samples was reported for modified test tubes. Thus, modified test tubes used for high-precision molecular testing have some advantages, since these decrease the risk of cross-contamination and improve immunocapture efficacy.

Keywords: immunocapture, monoclonal antibodies, RT-PCR, modified surface, cross-contamination, SARS-CoV-2

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-15-20035, <https://rscf.ru/project/23-15-20035/>

Author contribution: Rubalsky EO, Abdrakhmanova RA, Baeva GR, Rubalskaya TS — experimental procedure involving micro test tubes; Shcheblyakov DV, Favorskaya IA — preparation of monoclonal antibodies; Rubalsky EO, Lazko MV, Poroykiy SV, Gushchin VA — study design. The authors contributed to the search for and analysis of information, preparation of the draft, and manuscript writing equally.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Astrakhan State Medical University. (protocol No. 7 dated 22 February 2023).

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeny O. Roubalsky
Bakinskaya, 121, Astrakhan, 414000, Russia; e.o.rubalsky@gmail.com rubalsky@phage.pro

Received: 29.11.2024 **Accepted:** 19.12.2024 **Published online:** 28.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.068

Иммунозахват на основе специфических антител является ключевым этапом во многих лабораторных иммунологических методах исследований. Традиционно для реализации данного метода используют полистироловые микропланшеты, которые обеспечивают возможность одновременной обработки множества образцов. Полистирол, как правило, обладает способностью пассивно (неспецифически) иммобилизовать на своей поверхности практически любые крупные молекулы, имеющие доступные гидрофобные участки, например антитела [1]. Однако этот материал подвержен деформации при температурах выше +70 °С (а при длительном нагреве — выше +60 °С) [2]. Это серьезный технический недостаток при использовании дополнительных молекулярно-генетических этапов анализа, таких как термическая экстракция нуклеиновых кислот и термоциклирование (например, в реакции иммуно-ПЦР [3]), органичивающий широкое практическое применение таких методов. Предложенные в качестве альтернативы полистироловым планшетам собирающиеся в 96-луночный планшет стрипованные пробирки из поликарбоната устойчивы к нагреванию и обладают высокой сорбционной способностью [4].

Тем не менее, применение планшетов имеет высокий риск перекрестной контаминации [5, 6]. Этот риск может нивелироваться различными методическими подходами, например, использованием автоматизированных систем пробоподготовки. Применение классических для молекулярно-генетических исследований полипропиленовых пробирок потенциально могло бы снизить риск контаминации при работе по принципу «одной открытой пробирки». Однако использование пробирок ограничивается низкой сорбционной способностью полипропилена к белкам, в том числе к антителам [7], что препятствует их применению для высокочувствительных методов, к которым относятся иммуно-ПЦР, требующих стабильной иммобилизации антител иммунозахвата [4].

Развитие таких методов, как иммуномолекулярные реакции, может значительно повысить чувствительность и специфичность молекулярно-генетических исследований, что особенно важно для диагностики и мониторинга вирусных инфекций с высокой мутационной изменчивостью патогена, таких как вирус SARS-CoV-2 [8]. Следует отметить, что такие реакции до настоящего времени не получили широкого практического применения. Исследования возбудителя COVID-19 с применением иммуно-ПЦР до настоящего времени в научной литературе описаны не были. Вероятно, это связано со сложностью дизайна и постановки этапов реакции. Поэтому для успешного практического применения таких комбинированных подходов необходима оптимизация их ключевых компонентов с преодолением технологических ограничений, присущих существующим форматам реакций [4, 9].

В связи с этим нами предложено оригинальное покрытие полипропиленовых пробирок полистиролом. Это решение позволяет комбинировать преимущества обоих материалов: высокую сорбционную способность полистирола и термостойкость полипропилена при снижении риска перекрестной контаминации.

Целями исследования стали разработка метода простого получения и продемонстрированная на примере SARS-CoV-2 апробация новых пробирок для иммунозахвата, обеспечивающих эффективную иммобилизацию первичных антител, предназначенных для универсального применения в молекулярно-генетических исследованиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы SARS-CoV-2 и антитела

В качестве антигена использовали охарактеризованные образцы положительного контроля штамма ГК2020/1 (идентификатор GISAID: EPI_ISL_421275, вариант B.1.1.1, Ухань) и штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (идентификатор GISAID: EPI_ISL_12748382, вариант B.1.1.529+BA.* генетической линии Омикрон) коронавируса SARS-CoV-2, химически инактивированные при помощи глутарового альдегида в конечной концентрации 0,01% с последующей инкубацией при +4 °С в течение 24 ч.

Для исследования эффективности иммобилизации первичных антител (иммунозахвата) использовали экспериментальные моноклональные антитела к RBD спайк-белка коронавируса P2C5 (получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России), имеющие наиболее широкий спектр действия, охватывающий в том числе некоторые варианты линии Омикрон [10]. Кроме того, были протестированы моноклональные антитела R107 («Хайтест», Россия), обладающие специфичной активностью преимущественно к RBD вируса варианта B.1.1.1.

Исследование эффективности иммунозахвата с использованием полистироловых планшетов для ИФА

Для оптимизации процесса иммобилизации антител использовали 96-луночные плоскодонные полистироловые иммунологические планшеты FEP-101-896 (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd., Китай). В каждую лунку планшета вносили по 100 мкл антител в концентрации 10 мкг/мл, растворенных в 0,5 М карбонатном буфере (pH = 9,5), заклеивали планшеты пленкой и инкубировали при температуре +37 °С в течение 30 мин. В качестве блокирующего буфера применяли по 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH = 7,4) с добавлением 2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) с инкубированием при +37 °С в течение 30 мин. Промывочный буфер состоял из ФСБ (pH = 7,4) с добавлением 0,05% Твин-20.

После промывки лунок, выполненной трехкратно по 300 мкл с инкубированием в течение 45 с, в них вносили 50 мкл инактивированных предварительно разведенных в ФСБ до концентрации 1×10^6 копий/мл образцов SARS-CoV-2 и инкубировали при +37 °С в течение 30 мин. Затем проводили отмывку, выделение РНК с использованием набора РИБО-преп (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и постановку количественной ОТ-ПЦР.

Выделение РНК осуществляли по модифицированному протоколу производителя: в лунки полистиролового планшета вносили по 50 мкл буфера ТЕ, добавляли 155 мкл лизирующего раствора, заклеивали лунки пленкой для ИФА-планшетов и инкубировали при +65 °С в течение 10 мин. Затем переносили содержимое лунок полистироловых планшетов в микропробирки и дальнейшие этапы выделения РНК выполняли в соответствии с инструкцией производителя. Постановку количественной ОТ-ПЦР проводили с использованием набора реагентов «SARS-CoV-2-ПЦР» («Медипалтех», Россия) в сочетании с образцами химически инактивированного штамма ГК2020/1 в качестве калибратора. Все эксперименты проводили в десятикратной повторности ($n = 10$).

Исследование иммунозахвата с использованием модифицированных микропробирок

В качестве компонентов для изготовления модифицированных микропробирок использовали стерильные микропробирки из прозрачного полипропилена, свободные от ДНКаз и РНКаз, объемом 1,5 мл (SPINWIN Tarsons, Индия) и растворенный в ацетоне полистирол из иммунологических планшетов FEP-101-896 (Guangzhou Jet Bio-Filtration Co., Ltd., Китай). Раствор полистирола вносили асептически на дно пробирок в объеме 50 мкл и высушивали в вытяжном шкафу. Механическую стабильность полученного слоя полипропилена оценивали визуально после перемешивания внесенного 1 мл воды на вортексе при 2500 об./мин в течение 2 мин, путем двадцатикратного пипетирования с касанием наконечником пипетки-дозатора дна микропробирки и центрифугирования при 15 000 г в течение 15 мин. В модифицированные таким образом микропробирки вносили 100 мкл антител в карбонатном буфере (10 мкг/мл) и инкубировали при +37 °С в течение 30 мин с закрытыми крышками. После блокировки остаточной свободной от антител поверхности ФСБ с добавлением 2% БСА и промывки (аналогично планшетам) образцы SARS-CoV-2 вносили в объеме 50 мкл. Дальнейшие отмывку, выделение РНК и постановку ОТ-ПЦР выполняли так же, как при использовании полистироловых планшетов. Все этапы выделения РНК проводили в модифицированных микропробирках.

В качестве контроля использовали немодифицированные полипропиленовые пробирки. Все эксперименты проводили в десятикратной повторности ($n = 10$).

Исследование перекрестной контаминации

Для оценки перекрестной контаминации образцы штаммов GK2020/1 (вариант В.1.1.1) и hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (Омикрон) по 50 мкл вносили в шахматном порядке в 96-луночные планшеты и модифицированные пробирки с иммобилизованными антителами P2C5. После инкубации, промывки и выделения РНК проводили генотипирование при помощи ОТ-ПЦР. Для выявления штамма GK2020/1 проводили сиквенс-специфическую ОТ-ПЦР с оригинальными праймерами Wu_fw1mod 5'-CGTGGTTCCATGCTATACATG-3' и Wu_rv1mod 5'-CGTCCCTGTGGTAATAAACAC-3' в готовой реакционной смеси OneTube RT-PCR SYBR («Евроген», Россия) с детекцией в реальном времени по каналу SYBR-Green. Выявление штамма генетической линии Омикрон проводили с использованием набора реагентов АмплиТест

SARS-CoV-2 VOC v.3 (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Россия) согласно инструкции производителя. Для эксперимента использовали три планшета и 288 пробирок. Эксперимент проводили в ламинарном потоке воздуха в боксе микробиологической безопасности класса II типа A2 («Ламинарные системы», Россия).

Статистический анализ

Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM v.10.4.0 (Graphpad Software, Inc., США). Оценку распределения проводили с использованием теста Шапиро–Уилка. Для множественных сравнений параметрических данных применяли двусторонний метод ANOVA с тестом аддитивности Тьюки и уровнем значимости различий $p < 0,05$ (доверительный интервал — 95%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модифицированные микропробирки

Полипропиленовая микропробирка после модификации полистиролом представлена на рис. 1. Полученные модифицированные микропробирки были механически стабильны при перемешивании как на вортексе, так и путем пипетирования. Центрифугирование тоже не оказывало заметного влияния на целостность слоя полистирола.

Иммунозахват инактивированного SARS-CoV-2

При использовании штамма GK2020/1 (вариант В.1.1.1) в качестве антигена эффективный иммунозахват был выявлен как для антител P2C5, так и для антител R107 (рис. 2). Количество связанного антителами вируса оказалось достоверно выше при использовании модифицированных пробирок по сравнению с полистироловыми планшетами ($p < 0,0001$). Количество копий РНК SARS-CoV-2 в контрольных группах с использованием БСА было достоверно ниже количества, выявленного в группах с антителами при использовании как планшетов, так и модифицированных пробирок. При применении пробирок без покрытия определялось одинаково низкое количество РНК коронавируса ($p > 0,05$) во всех группах, что свидетельствует об отсутствии специфического иммунозахвата антигена независимо от применения антител.

При использовании штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (генетическая линия Омикрон) эффективный иммунозахват наблюдали только для антител P2C5 (рис. 3). Антитела R107, специфичные к RBD преимущественно

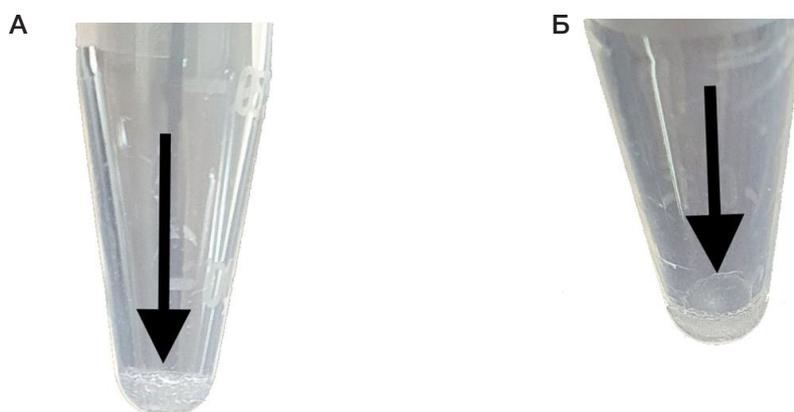


Рис. 1. Полипропиленовая пробирка после модификации полистиролом: вид сбоку (А) и вид под углом $\approx 45^\circ$ (Б)

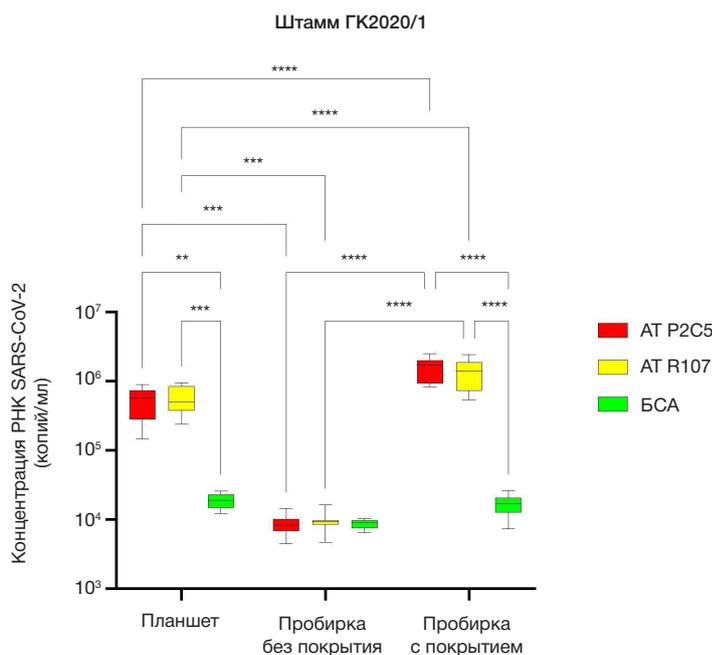


Рис. 2. Результаты иммунозахвата штамма GK2020/1. Красным цветом отмечены моноклональные антитела P2C5, желтым — R107, зеленым — контрольная группа с БСА. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$

вируса SARS-CoV-2 варианта Ухань, не показали значительного отличия от контрольной группы с БСА. Таким образом, штамм линии Омикрон продемонстрировал способность ускользать от нейтрализующих антител R107, что соответствует данным других исследователей о снижении эффективности некоторых моноклональных антител против новых вариантов SARS-CoV-2 [11, 12]. Модифицированные пробирки обеспечивали лучшие результаты, чем полистироловые планшеты, как для линии В.1.1.1, так и для линии Омикрон.

Перекрестная контаминация

Перекрестная контаминация была обнаружена в 14 из 288 образцов при использовании полистироловых планшеты (рис. 4). Контаминация выявлялась как смешение

РНК штаммов GK2020/1 и hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021, что подтверждает риск переноса материала между лунками в таких условиях. В модифицированных пробирках перекрестной контаминации не было выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что модифицированные полипропиленовые пробирки с полистироловым покрытием обладают значительными преимуществами по сравнению с традиционными полистироловыми планшетами, включая снижение риска перекрестной контаминации и улучшение эффективности иммунозахвата. Эти данные согласуются с исследованиями, демонстрирующими, что полистироловые планшеты являются хорошим материалом для иммобилизации антител, но их использование ограничено

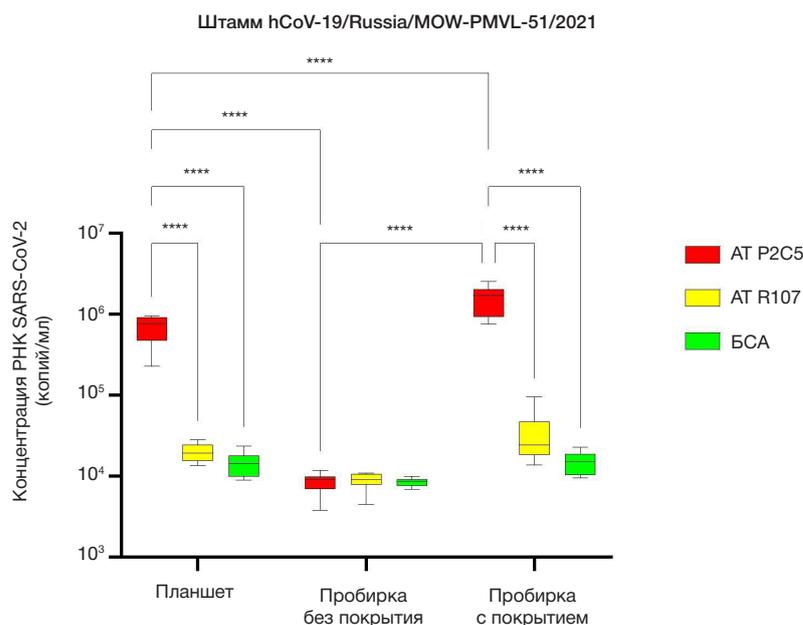


Рис. 3. Результаты иммунозахвата штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021. Красным цветом отмечены моноклональные антитела P2C5, желтым — R107, зеленым — контрольная группа с БСА. **** — $p < 0,0001$

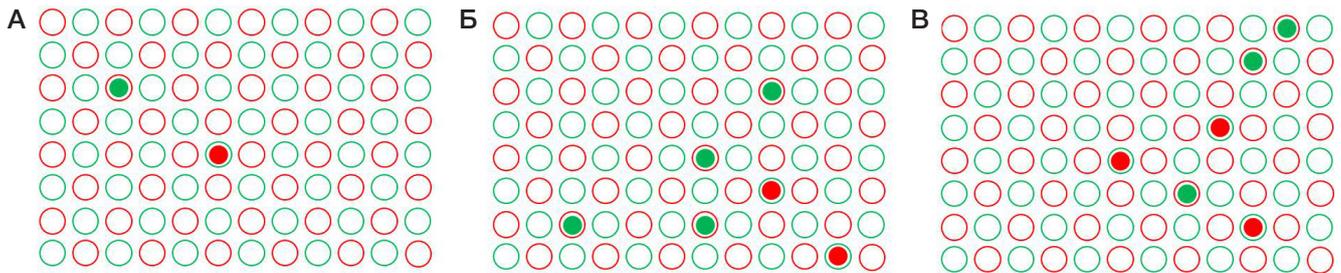


Рис. 4. Выявленная перекрестная контаминация при выделении РНК SARS-CoV-2 в 96-луночных планшетах. Лунки, представленные в виде красных кругов, содержат штамм GK2020/1 (вариант В.1.1.1). Лунки, представленные в виде зеленых кругов, содержат штамм hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 (вариант В.1.1.529+ВА.*генетическая линия Омикрон). Красные точки в зеленых кругах указывают на контаминацию штамма hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021 штаммом GK2020/1. Зеленые точки в красных кругах указывают на контаминацию штамма GK2020/1 штаммом hCoV-19/Russia/MOW-PMVL-51/2021. (А–В) — три последовательные постановки тремя различными операторами

из-за слабой устойчивости к высоким температурам и рискам контаминации [2, 5, 6].

Различия в эффективности антител P2C5 и R107 в работе с разными штаммами SARS-CoV-2 соответствуют данным о значительных мутациях в RBD линии Омикрон, которые снижают эффективность антител, специфичных варианту В.1.1.1 (Ухань) вируса [13, 14]. Предполагается, что такие мутации приводят к конформационным изменениям RBD, что препятствует связыванию антител, как это ранее описывалось для антител первого поколения против SARS-CoV-2 [15]. Высокая эффективность P2C5, охватывающих широкий спектр вариантов, включая Омикрон, подтверждает их универсальность и актуальность для мониторинга новых штаммов.

Отсутствие перекрестной контаминации в модифицированных пробирках можно объяснить отсутствием непосредственного контакта между образцами и минимизацией аэрозольного переноса. Аналогичные выводы были сделаны в исследованиях, где использовали другие замкнутые системы для молекулярной диагностики [16].

Несмотря на положительные результаты, требуется дальнейшая оптимизация условий иммобилизации антител и выделения РНК для повышения воспроизводимости метода при использовании модифицированных пробирок. Кроме того, для широкого применения пробирок необходимо провести тестирование на других патогенах, чтобы подтвердить универсальность метода. Дальнейшие исследования и усовершенствования пробирок могут быть также проведены по следующим направлениям: изучение пригодности и сочетаемости полипропилена и полистирола

различных марок; снижение неспецифического сигнала за счет применения пробирок из полипропилена с низкой адгезивной способностью; автоматизация процесса нанесения полистирола.

В целом, модифицированные пробирки представляют собой перспективную основу для комбинированных иммунологических и молекулярно-генетических исследований, требующих высокой чувствительности и точности, особенно в условиях высокой изменчивости патогенов, таких как SARS-CoV-2.

Выводы

Модифицированные полипропиленовые пробирки с полистироловым покрытием показали высокую эффективность иммунозахвата и отсутствие перекрестной контаминации, превосходя традиционные полистироловые планшеты. Эти результаты подтверждают достижение целей исследования. Антитела P2C5 продемонстрировали универсальность против различных линий SARS-CoV-2, включая Омикрон, что делает их перспективными для диагностики новых вариантов возбудителя COVID-19. Дальнейшие исследования должны быть направлены на тестирование пробирок с другими патогенами и улучшение их функциональных характеристик. Возможные направления применения модифицированных полипропиленовых пробирок с полистироловым покрытием включают клиническую диагностику и разработку высокочувствительных методов для поиска, селекции и выявления вирусов.

Литература

- Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods*. 1992; 150 (1–2): 77–90. DOI: 10.1016/0022-1759(92)90066-3. PMID: 1613260.
- Donald AM. The effect of temperature on crazing mechanisms in polystyrene. *J Mater Sci*. 1985; 20: 2630–8. DOI: 10.1007/BF00556095.
- Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258 (5079): 120–2. DOI: 10.1126/science.1439758. PMID: 1439758.
- Горшков А. С., Печенкин Д. В., Кузнецовский А. В., Балакин В. А. ПЦР-амплифицированный иммуноанализ (иммуно-ПЦР): принцип метода, варианты исполнения, возможности и перспективы использования для выявления патогенных биологических агентов. *Вестник войск РХБ защиты*. 2021; 5 (4): 366–75. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-4-366-375>.
- Minich JJ, Sanders JG, Amir A, Humphrey G, Gilbert JA, Knight R. Quantifying and Understanding Well-to-Well Contamination in Microbiome Research. *mSystems*. 2019; 4 (4): e00186–19. DOI: 10.1128/mSystems.00186-19. PMID: 31239396; PMCID: PMC6593221.
- Lou YC, Hoff J, Olm MR, West-Roberts J, Diamond S, Firek BA, et al. Using strain-resolved analysis to identify contamination in metagenomics data. *Microbiome*. 2023; 11 (1): 36. DOI: 10.1186/s40168-023-01477-2. PMID: 36864482; PMCID: PMC9979413.
- Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR Jr. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem*. 2011; 414 (1): 38–46. DOI: 10.1016/j.ab.2011.02.009. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21315060; PMCID: PMC3290000.
- Wu X, Liu J, Zhang H, Zhou H, Wang W, Ma Y, et al. Immunomolecular assay based on selective virion capture by spike antibody and viral nucleic acid amplification for detecting intact SARS-CoV-2

- particles. *J Nanobiotechnology*. 2022; 20 (1): 399. DOI: 10.1186/s12951-022-01558-8. PMID: 36064407; PMCID: PMC9444083.
9. Malou N, Raoult D. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol*. 2011; 19(6): 295–302. DOI: 10.1016/j.tim.2011.03.004. PMID: 21478019.
 10. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol*. 2022; 13: 822159. DOI: 10.3389/fimmu.2022.822159. PMID: 35281053; PMCID: PMC8907979.
 11. Shah M, Woo HG. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Front Immunol*. 2022; 12: 830527. DOI: 10.3389/fimmu.2021.830527. PMID: 35140714; PMCID: PMC8819067.
 12. Pochtovyi AA, Kustova DD, Siniavin AE, Dolzhikova IV, Shidlovskaya EV, Shpakova OG, et al. In Vitro Efficacy of Antivirals and Monoclonal Antibodies against SARS-CoV-2 Omicron Lineages XBB.1.9.1, XBB.1.9.3, XBB.1.5, XBB.1.16, XBB.2.4, BQ.1.1.45, CH.1.1, and CL.1. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11 (10): 1533. DOI: 10.3390/vaccines11101533. PMID: 37896937; PMCID: PMC10611309.
 13. Calvaresi V, Wrobel AG, Toporowska J, Hammerschmid D, Doores KJ, Bradshaw RT, et al. Structural dynamics in the evolution of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Nat Commun*. 2023; 14 (1): 1421. DOI: 10.1038/s41467-023-36745-0. PMID: 36918534; PMCID: PMC10013288.
 14. Reuter N, Chen X, Kropff B, Peter AS, Britt WJ, Mach M, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Is Capable of Inducing Cell-Cell Fusions Independent from Its Receptor ACE2 and This Activity Can Be Impaired by Furin Inhibitors or a Subset of Monoclonal Antibodies. *Viruses*. 2023; 15 (7): 1500. DOI: 10.3390/v15071500. PMID: 37515187; PMCID: PMC10384293.
 15. Чуланов В. П., Шмаков Р. Г., Лioзнов Д. А., Абдулганиева Д. И., Валишин Д. А., Грабовский В. М., и др. Резолюция Совета экспертов. Нейтрализующие моноклональные антитела при COVID-19 — место в терапии уязвимых категорий больных. *Инфекционные болезни*. 2023; 21 (1): 152–61. DOI: 10.20953/1729-9225-2023-1-152-161.
 16. Venkatesan G, Kushwaha A, Kumar A, Bora DP, Sasikumar P. An improved visual closed tube Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of orf virus in sheep and goats. *Vet Ital*. 2022; 58 (2). DOI: 10.12834/VetIt.2426.15340.2. PMID: 36586114.

References

1. Butler JE, Ni L, Nessler R, Joshi KS, Suter M, Rosenberg B, et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. *J Immunol Methods*. 1992; 150 (1–2): 77–90. DOI: 10.1016/0022-1759(92)90066-3. PMID: 1613260.
2. Donald AM. The effect of temperature on crazing mechanisms in polystyrene. *J Mater Sci*. 1985; 20: 2630–8. DOI: 10.1007/BF00556095.
3. Sano T, Smith CL, Cantor CR. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258 (5079): 120–2. DOI: 10.1126/science.1439758. PMID: 1439758.
4. Gorshkov AS, Pechenkin DV, Kuznecovskij AV, Balakin VA. PCR-amplificirovannyj immunoanaliz (immuno-PCR): princip metoda, varianty ispolnenija, vozmozhnosti i perspektivy ispol'zovanija dlja vyjavlenija patogennyh biologicheskikh agentov. *Vestnik vojsk RHB zashhity*. 2021; 5 (4): 366–75. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2021-5-4-366-375>. Russian.
5. Minich JJ, Sanders JG, Amir A, Humphrey G, Gilbert JA, Knight R. Quantifying and Understanding Well-to-Well Contamination in Microbiome Research. *mSystems*. 2019; 4 (4): e00186–19. DOI: 10.1128/mSystems.00186-19. PMID: 31239396; PMCID: PMC6593221.
6. Lou YC, Hoff J, Olm MR, West-Roberts J, Diamond S, Firek BA, et al. Using strain-resolved analysis to identify contamination in metagenomics data. *Microbiome*. 2023; 11 (1): 36. DOI: 10.1186/s40168-023-01477-2. PMID: 36864482; PMCID: PMC9979413.
7. Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR Jr. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem*. 2011; 414 (1): 38–46. DOI: 10.1016/j.ab.2011.02.009. Epub 2011 Mar 9. PMID: 21315060; PMCID: PMC3290000.
8. Wu X, Liu J, Zhang H, Zhou H, Wang W, Ma Y, et al. Immunomolecular assay based on selective virion capture by spike antibody and viral nucleic acid amplification for detecting intact SARS-CoV-2 particles. *J Nanobiotechnology*. 2022; 20 (1): 399. DOI: 10.1186/s12951-022-01558-8. PMID: 36064407; PMCID: PMC9444083.
9. Malou N, Raoult D. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol*. 2011; 19(6): 295–302. DOI: 10.1016/j.tim.2011.03.004. PMID: 21478019.
10. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol*. 2022; 13: 822159. DOI: 10.3389/fimmu.2022.822159. PMID: 35281053; PMCID: PMC8907979.
11. Shah M, Woo HG. Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Front Immunol*. 2022; 12: 830527. DOI: 10.3389/fimmu.2021.830527. PMID: 35140714; PMCID: PMC8819067.
12. Pochtovyi AA, Kustova DD, Siniavin AE, Dolzhikova IV, Shidlovskaya EV, Shpakova OG, et al. In Vitro Efficacy of Antivirals and Monoclonal Antibodies against SARS-CoV-2 Omicron Lineages XBB.1.9.1, XBB.1.9.3, XBB.1.5, XBB.1.16, XBB.2.4, BQ.1.1.45, CH.1.1, and CL.1. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11 (10): 1533. DOI: 10.3390/vaccines11101533. PMID: 37896937; PMCID: PMC10611309.
13. Calvaresi V, Wrobel AG, Toporowska J, Hammerschmid D, Doores KJ, Bradshaw RT, et al. Structural dynamics in the evolution of SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Nat Commun*. 2023; 14 (1): 1421. DOI: 10.1038/s41467-023-36745-0. PMID: 36918534; PMCID: PMC10013288.
14. Reuter N, Chen X, Kropff B, Peter AS, Britt WJ, Mach M, et al. SARS-CoV-2 Spike Protein Is Capable of Inducing Cell-Cell Fusions Independent from Its Receptor ACE2 and This Activity Can Be Impaired by Furin Inhibitors or a Subset of Monoclonal Antibodies. *Viruses*. 2023; 15 (7): 1500. DOI: 10.3390/v15071500. PMID: 37515187; PMCID: PMC10384293.
15. Chulanov VP, Shmakov RG, Lioznov DA, Abdulganieva DI, Valishin DA, Grabovsky VM, i dr. Rezolucija Soveta jekspertov. Nejtralizujushhie monoklonal'nye antitela pri COVID-19 — mesto v terapii uязvimyh kategorij bol'nyh. *Infekcionnye bolezni*. 2023; 21 (1): 152–61. DOI: 10.20953/1729-9225-2023-1-152-161. Russian.
16. Venkatesan G, Kushwaha A, Kumar A, Bora DP, Sasikumar P. An improved visual closed tube Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid identification of orf virus in sheep and goats. *Vet Ital*. 2022; 58 (2). DOI: 10.12834/VetIt.2426.15340.2. PMID: 36586114.

ЦЕПЕЦЕНТРИЧНОСТЬ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ У ПЕРВИЧНО АКТИВИРОВАННЫХ ЭФФЕКТОРОВ И РЕСТИМУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ПАМЯТИ

А. А. Калинина¹, М. В. Кубекина², Н. А. Персиянцева¹, А. В. Брутер^{1,2}, Л. М. Хромых¹, Д. Б. Казанский¹✉

¹ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена, Москва, Россия

T-клетки, эффекторы адаптивного иммунитета, оснащены антигенраспознающим T-клеточным рецептором (ТКР), который представляет собой $\alpha\beta$ -гетеродимер. Для ряда ТКР было показано функциональное доминирование одной цепи, и эта особенность рецептора получила название цепецентричности. В настоящее время неизвестно, является ли цепецентричность врожденным свойством некоторых ТКР и каков механизм ее формирования. Целью работы было установить частоту встречаемости подобных рецепторов в репертуаре эффекторов и рестимулированных клеток памяти мыши, специфичных к антигенам аллогенной опухоли. Сформированные в ходе первичного иммунного ответа *in vivo* долгоживущие клетки памяти рестимулировали клетками иммунизирующей опухоли *in vitro*. Первичные эффекторы получали в культуре *in vitro* путем стимуляции T-клеток неиммунизированных мышей клетками этой же аллогенной опухоли. Методом NGS-секвенирования были созданы библиотеки ТКР эффекторов, вовлеченных в первичный и вторичный иммунный ответ. Для идентификации цепецентрических рецепторов были отобраны по 10 вариантов ТКР α из каждого репертуара. Путем трансдукции T-клетки интактных мышей модифицировали индивидуальными вариантами α -цепей ТКР с последующей оценкой уровня их пролиферации в присутствии специфических аллогенных стимуляторов. В ходе скрининга *in vitro* выявлено 10% цепецентрических рецепторов в пуле первичных эффекторов, при этом доля таких ТКР в репертуаре реактивированных клеток памяти составила 30%. Таким образом, цепецентричность является исходно присущим свойством некоторых ТКР, но вторичная антигенная стимуляция может быть фактором селекции клонотипов с такими рецепторами.

Ключевые слова: T-клеточный рецептор, цепецентричность, доминантно-активная α -цепь, первично активированные эффекторы, T-клетки памяти

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00342 (2022–2024).

Благодарности: авторы благодарят О. Британову (ИБХ РАН) и К. Лупырь (Сколковский институт науки и технологий) за получение и биоинформатический анализ библиотек α -цепей ТКР мыши.

Вклад авторов: А. А. Калинина — планирование исследования, анализ литературы, проведение экспериментов, анализ и интерпретация результатов, написание статьи; М. В. Кубекина — клонирование; Н. А. Персиянцева — проведение трансфекций; А. В. Брутер — подбор олигонуклеотидов, клонирование; Л. М. Хромых — планирование исследования, анализ литературы, редактирование статьи; Д. Б. Казанский — планирование исследования, анализ литературы, анализ и интерпретация результатов, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России (протокол № ЗП-10.06.2022 от 10 июня 2022 г.), проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Борисович Казанский
Каширское ш., д. 24, стр. 15, г. Москва, 115478, Россия; kazansky1@yandex.ru

Статья получена: 09.10.2024 **Статья принята к печати:** 30.10.2024 **Опубликована онлайн:** 30.11.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.052

T-CELL RECEPTOR CHAIN CENTRICITY IN THE PRIMARILY ACTIVATED EFFECTORS AND RE-STIMULATED MEMORY CELLS

Kalinina AA¹, Kubekina MV², Persiyantseva NA¹, Bruter AV^{1,2}, Khromykh LM¹, Kazansky DB¹✉

¹ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

T cells, the adaptive immunity effectors, carry an antigen-recognizing T-cell receptor (TCR) that represents an $\alpha\beta$ heterodimer. Functional dominance of one chain has been reported for a number of TCRs. This feature is called chain centricity. Today, it is unclear whether chain centricity is an inherent feature of some TCRs, and what mechanism underlies its development. The study aimed to determine the abundance of such receptors in the repertoire of primarily activated effectors and re-stimulated memory cells of mice specific to the allogeneic tumor antigens. The long-lived memory cells formed in the primary immune response *in vivo* were *in vitro* re-stimulated with the immunizing tumor cells. Primary effectors were obtained *in vitro* in the culture by stimulation of T cells of non-immunized mice with cells of the same allogeneic tumor. TCR libraries of effectors involved in the primary and secondary immune response were created by NGS sequencing. To identify chain-centric TCRs, 10 TCR α variants were selected from each repertoire. T cells of intact mice were modified with individual TCR α -chain variants by transduction, with subsequent assessment of T cell proliferation under exposure to specific allogeneic stimulators. *In vitro* screening revealed 10% of chain-centric receptors in the primary effector pool, and the proportion of such TCRs in the repertoire of re-activated memory cells was 30%. Thus, chain centricity is an inherent property of some TCRs, but secondary antigenic stimulation can be a factor for selection of clonotypes with such receptors.

Keywords: T-cell receptor, chain centricity, dominant-active α -chain, primarily activated effectors, memory T cells

Funding: the study was supported by the RSF grant No. 22-15-00342 (2022–2024).

Acknowledgements: the authors would like to express their gratitude to O. Britanova (Institute of Bioorganic Chemistry RAS) and K. Lupyr (Skolkovo Institute of Science and Technology) for generation and bioinformatics analysis of the mouse TCR α -chain libraries.

Author contribution: Kalinina AA — study planning, literature review, experimental procedure, data analysis and interpretation, manuscript writing; Kubekina MV — cloning; Persiyantseva NA — transfection; Bruter AV — selection of oligonucleotides, cloning; Khromykh LM — study planning, literature review, data analysis and interpretation, manuscript editing; Kazansky DB — study planning, literature review, data analysis and interpretation, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Blokhin National Medical Research Center of Oncology (protocol No. ЗП-10.06.2022 dated 10 June 2022), it was conducted in strict compliance with the provisions of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry B. Kazansky
Kashirskoye Shosse, 24, bld. 15, Moscow, 115478, Russia; kazansky1@yandex.ru

Received: 09.10.2024 **Accepted:** 30.10.2024 **Published online:** 30.11.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.052

T-клетки являются важнейшими эффекторами адаптивного иммунитета. Для реализации своих функций они оснащены T-клеточным рецептором (ТКР), который участвует в распознавании пептидных антигенов, представленных собственными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). ТКР представляет собой гетеродимер, в преобладающем типе T-клеток состоящий из α - и β -цепи. Согласно классической парадигме, обе цепи ТКР вносят равный вклад в распознавание МНС/пептидных комплексов. Однако для ряда ТКР было показано, что α - или β -цепь может доминировать во взаимодействии с антигеном и определять специфичность всего рецептора [1]. Около десяти лет назад был введен термин «цепецентричность ТКР» для описания данного феномена и ТКР с асимметричной функциональной активностью цепей получили название цепецентрических рецепторов [2, 3]. Это свойство некоторых ТКР может значительно упростить и повысить эффективность получения терапевтических T-клеточных продуктов для иммунотерапии инфекционных и онкологических заболеваний [1, 4].

На сегодняшний момент не известно, является ли цепецентричность врожденным свойством некоторых ТКР и каков механизм формирования подобных рецепторов. В большинстве исследований цепецентрические ТКР идентифицировали в иммунном репертуаре человека или мыши [2, 3, 5–7], что может указывать на экспрессию таких рецепторов преимущественно антиген-примированными T-клетками. Ранее было показано, что естественно сформированный пул T-клеток памяти мыши содержит около 20% цепецентрических рецепторов [4], но до конца не ясно, какова их доля в репертуаре эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ. Выяснение данного вопроса позволит установить важные аспекты природы цепецентрических ТКР: 1) является ли цепецентричность свойством, исходно присущим некоторым рецепторам; 2) какова роль антигенной стимуляции в формировании или отборе таких ТКР.

Цель данной работы заключалась в определении частоты встречаемости ТКР с доминантно-активной α -цепью в репертуаре первично активированных эффекторов и рестимулированных клеток памяти мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали самок мышей инбредной линии C57BL/6 (гаплотип H2-K^b) (весом 18–20 г, 6–8-недельного возраста) из экспериментально-биологической лаборатории НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (ФГБУ «НМИЦ онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия). Животных содержали при стандартных условиях (20–24 °C, 40% относительной влажности, 12-часовой световой режим) и выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации. Для генерации клеток памяти *in vivo* девять мышей C57BL/6 иммунизировали клетками аллогенной мастоцитомы P815 (K^dD^d) путем однократного внутрибрюшинного введения 1×10^7 опухолевых клеток/мышь. Через два месяца после иммунизации [8] животных выводили из эксперимента, как указано выше, и стерильно извлекали селезенку. Клетки селезенки осторожно выдавливали из стромы органа в гомогенизаторе Поттера (DWK Life Sciences, Германия) в 3 мл PBS. Затем проводили цитометрический анализ спленоцитов на приборе FACSCantoll (BD, США) с использованием флуоресцентно

меченых антител (BioLegend, США) к поверхностным маркерам T-клеток: CD3-PE, CD8-Pacific blue, CD44-APC и CD62L-APC-Cy7. Клеточный дебрис исключали из анализа по показателям светорассеяния и включению пропидий йодида (BD, США). Долю T-клеток (%) в общей популяции живых лейкоцитов селезенки определяли по экспрессии маркера CD3. Относительное количество (%) цитотоксических CD8⁺-T-клеток анализировали в пуле CD3⁺-лимфоцитов. Сформированные после иммунизации *in vivo* долгоживущие CD8⁺-T-клетки памяти определяли по коэкспрессии маркеров CD44 и CD62L (рис. 1). Клетки селезенки P815-иммунизированных мышей без предварительной сортировки рестимулировали *in vitro* антигенами иммунизирующей опухоли [9]. Для этого спленоциты высевали в триплетах в круглодонные 96-луночные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) в количестве 4×10^5 клеток/луноку. Клетки мастоцитомы P815 обрабатывали цитостатиком митомицином C (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.; Япония) в дозе 50 мкг/мл в течение 60 мин при 37 °C и вносили к спленоцитам в соотношении 1 : 10. Клетки культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), обогащенной 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, GE Healthcare, США), 0,01 мг/мл ципрофлаксацина (KRKA, Словения) и 10 мкМ 2-меркаптоэтанол (Merck, Германия), в течение 72 ч при 37 °C, 5% CO₂. Для индукции первично активированных CD8⁺-эффекторов клетки селезенки шести интактных (без иммунизации мастоцитомой P815) мышей C57BL/6 культивировали *in vitro* с клетками P815 в течение 72 ч, как описано выше. Для оценки фоновой пролиферации клетки селезенки интактных и иммунизированных мышей аналогично культивировали без P815. Уровень пролиферации (*counts per minute*) клеток в культуре спленоцитов измеряли по включению ³H-тимидина (1 мКи/луноку) («Изотоп», Россия), который вносили за 8 ч до окончания культивирования. Индекс антиген-индуцированного ответа рассчитывали как соотношение уровня пролиферации спленоцитов в присутствии P815 к соответствующей фоновой пролиферации (рис. 2).

Клетки первично активированных эффекторов и рестимулированных клеток памяти, полученные, как описано выше, от одной интактной (неиммунизированной) и одной иммунизированной мыши соответственно, использовали для создания библиотек кДНК ТКР методом NGS-секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США) [9].

Полноразмерную кДНК α -цепи ТКР из каждого репертуара клонировали в ретровирусный вектор MigRI, содержащий промотор PGK [4]. Трансфекцию пакующей линии HEK293T проводили кальций-фосфатным методом. Для получения T-лимфоцитов, трансдуцированных индивидуальным вариантом ТКР α , проводили предварительную активацию T-клеток интактных (неиммунизированных) мышей. Для этого животных умерщвляли методом цервикальной дислокации, стерильно извлекали селезенку и брыжеечный лимфатический узел и выделяли клетки из этих органов, как описано выше. Полученные клетки затем активировали *in vitro* T-клеточным митогеном конканавалином A (3 мкг/мл) (Sigma Aldrich, США) в течение 24 ч и проводили трансдукцию путем двух спинокуляций с ретровирусами, содержащими индивидуальный вариант ТКР α , при 2000 \times g в течение 2 ч (22 °C) [10]. Уровень модификации лимфоцитов определяли через 48 ч методом проточной цитофлуориметрии по измерению экспрессии репортерного белка GFP в контрольной пробе T-клеток,

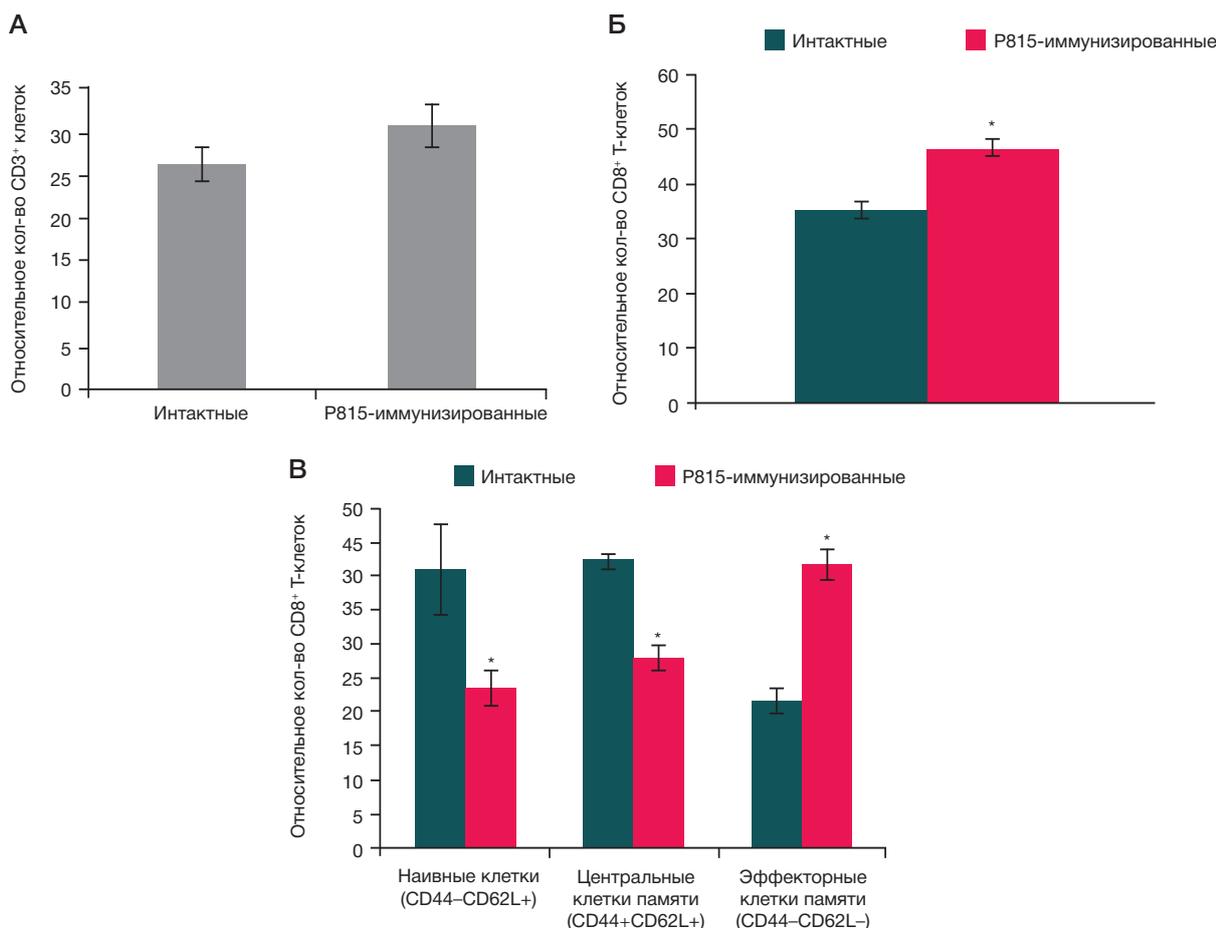


Рис. 1. Анализ Т-клеток селезенки мышей после *in vivo* иммунизации клетками аллогенной опухоли. Мышей C57BL/6 ($n = 9$) иммунизировали внутрибрюшинно клетками аллогенной мастоцитомы P815. Через 2 месяца после иммунизации клетки селезенки животных анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контроля использовали спленоциты интактных (без иммунизации P815) мышей C57BL/6 ($n = 6$). **А)** Относительное количество (%) Т-клеток (CD3⁺). **Б)** Доля (%) цитотоксических CD8⁺ Т-клеток. **В)** Доля (%) CD8⁺ Т-клеток с фенотипом наивных клеток (CD44⁻CD62L⁺), центральных клеток памяти (CD44⁺CD62L⁺) и эффекторных клеток памяти (CD44⁻CD62L⁻). Данные представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). * $p \leq 0,05$ по сравнению с интактным контролем (t -критерий Стьюдента)

аналогично трансдуцированных GFP-ретровирусом [10]. Эффективность трансдукции составила 40–70% (данные не представлены).

Через 48 ч после трансдукции Т-клетки высевали в триплетах в плоскостонные 96-луночные планшеты (Corning Costar, Sigma Aldrich, США) в количестве 1×10^5 кл./луноку. Клетки сингенной для мышей C57BL/6 лимфомы EL-4 и иммунизирующей мастоцитомы P815 обрабатывали митомицином С, как описано выше. Для определения уровня пролиферации модифицированных Т-клеток в присутствии сингенных стимуляторов, обработанные цитостатиком клетки EL-4 вносили к Т-лимфоцитам в соотношении 1 : 2. Для оценки уровня специфической антиген-индуцированной пролиферации модифицированные Т-клетки аналогично сокультивировали с клетками P815, обработанными митомицином С. Клетки культивировали в 200 мкл среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), обогащенной как описано выше, в течение 72 ч при 37 °С, 5% CO₂. В качестве контролей использовали нетрансдуцированные лимфоциты (НТЛ) и GFP-модифицированные Т-клетки. Для оценки уровня фоновой пролиферации Т-лимфоциты (НТЛ, ТКР α - и GFP-трансдуцированные) аналогично культивировали без опухолевых клеток. Уровень клеточной пролиферации оценивали с помощью набора CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Оптическую плотность (OD) измеряли на

микропланшетном спектрофотометре Infinite F50 (Tecan, Швейцария). Скрининг *in vitro* каждого варианта ТКР α проводили минимум в двух независимых экспериментах.

На рис. 1 и 2 представлены данные трех независимых экспериментов как средняя \pm стандартная ошибка среднего ($mean \pm SEM$) ($n = 6-9$). На рис. 3 представлены частоты уникальных клонотипов ТКР α в каждом из исследуемых репертуаров. На рис. 4 представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как $mean \pm SEM$ для трех технических повторов. Статистический анализ проводили с использованием непарного t -критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения выборки по критерию Колмогорова–Смирнова. Различия признавали достоверными при $p < 0,05$. Статистический анализ проводили в программе Prism, v.8.1.2 (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе использовали экспериментальную модель генерации долгоживущих Т-клеток памяти, которая предусматривает *in vivo* иммунизацию мышей C57BL/6 (H2-K^b) клетками аллогенной мастоцитомы P815 (K^dD^a). В силу аллогенных различий в молекулах МНС класса I у реципиента развивается преимущественно CD8⁺-Т-клеточный ответ на трансплантируемую опухоль. В селезенке иммунизированных животных не отмечали

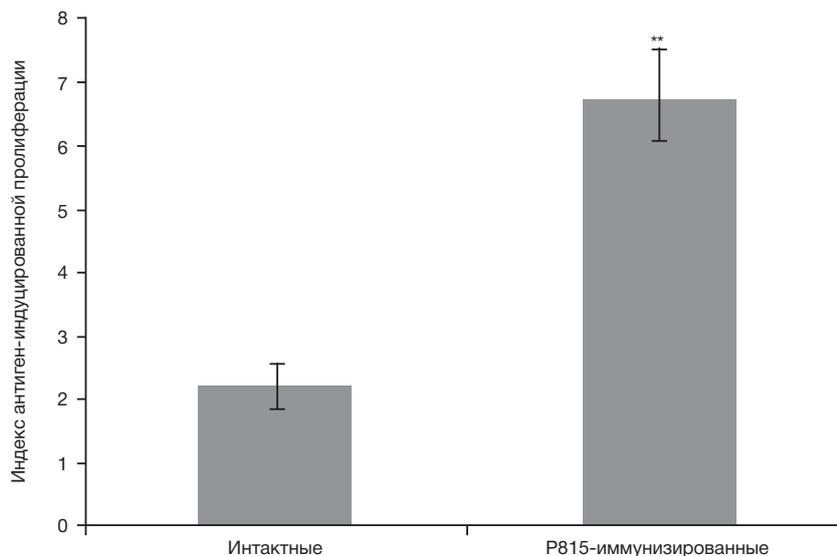


Рис. 2. Уровень антиген-индуцированной пролиферации *in vitro* Т-клеток при первичном и вторичном иммунном ответе на клетки аллогенной опухоли. Клетки селезенки интактных (без иммунизации P815) и P815-иммунизированных мышей C57BL/6 культивировали в присутствии аллогенной мастоцитомы P815 в течение 72 ч. Спленоциты, аналогично культивированные без антигенной стимуляции, использовали для оценки фоновой пролиферации. Индекс антиген-индуцированного пролиферативного ответа на аллоантигены рассчитывали, как описано в Материалах и методах. Данные представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). ** $p \leq 0,01$ (t-критерий Стьюдента)

увеличения относительного количества Т-клеток по сравнению с интактными мышами (рис. 1А), однако доля CD8⁺-Т-клеток была достоверно увеличена после иммунизации по сравнению с контролем (рис. 1Б). Кроме того, среди CD8⁺-Т-клеток селезенки иммунизированных мышей отмечено накопление лимфоцитов с фенотипом эффекторных клеток памяти (CD44⁺CD62L⁻), доля которых возросла в 1,9 раза по сравнению с аналогичной популяцией CD8⁺-Т-клеток в селезенке интактных мышей (рис. 1В). Полученные данные свидетельствуют о формировании пула долгоживущих CD8⁺-клеток памяти по завершении первичного иммунного ответа *in vivo*.

Учитывая, что поверхностный активационный фенотип Т-клетки напрямую не коррелирует с опытом ее взаимодействия с антигеном и функциональным статусом [11], для подтверждения генерации истинных Т-клеток памяти в ходе *in vivo* иммунизации лимфоциты селезенки иммунизированных мышей рестимулировали *in vitro* антигенами иммунизирующей опухоли. В культуре *in vitro* был получен первичный пролиферативный ответ спленоцитов интактных мышей на клетки аллогенной мастоцитомы P815, который в два раза превышал значения фоновой пролиферации (рис. 2). При этом уровень антиген-индуцированной пролиферации спленоцитов иммунизированных животных в 3 раза превышал соответствующее значение в культуре клеток интактных мышей (рис. 2). Таким образом, функциональный тест *in vitro* показал первичный иммунный ответ на клетки аллогенной опухоли и усиленный вторичный ответ Т-клеток памяти.

Эту экспериментальную систему использовали для генерации эффекторов первичного и вторичного иммунного ответа на клетки аллогенной опухоли и создания библиотек их α -цепей ТКР (ТКР α). Для выявления клонотипов ТКР α , вовлеченных в иммунный ответ на антигены P815, репертуар первично активированных эффекторов и рестимулированных клеток памяти сравнили соответственно с репертуаром ТКР α неиммунизированных мышей и иммунизированных мышей без антигенной стимуляции *in vitro*. В каждой библиотеке были определены варианты ТКР α , частота которых после

стимуляции минимум в три раза превышала частоту этого же клонотипа в соответствующем репертуаре без антигенной стимуляции [9]. Для дальнейших исследований были отобраны по 10 вариантов ТКР α , уникальных для репертуара первично активированных эффекторов или рестимулированных клеток памяти (рис. 3).

Доминантно-активные ТКР α определяли в тест-системе *in vitro*. Для этого Т-клетки интактных мышей, модифицированные каждым вариантом ТКР α , помещали в культуру с сингенными стимуляторами (клетки EL-4) или специфическими аллогенными стимуляторами (клетки P815) (рис. 4). Соответствующую α -цепь считали доминантно-активной, если уровень пролиферации трансдуцированных лимфоцитов в присутствии P815 достоверно превышал уровень пролиферации этих же клеток без антигенной стимуляции (фон), в присутствии EL-4 (стимуляция сингенной опухоли), а также если он был достоверно выше значений антиген-индуцированной пролиферации НТЛ и GFP-модифицированных Т-клеток (рис. 4).

В результате скрининга была выявлена одна доминантно-активная ТКР α из репертуара первично активированных эффекторов (#3; рис. 4А); уровень пролиферативного ответа Т-клеток, модифицированных α -цепью ТКР #3, в присутствии специфического аллогенного стимулятора (клеток P815) в 1,3 раза ($p < 0,05$) превышал уровень их пролиферации в культуре с сингенными стимуляторами (клетками EL-4). В репертуаре реактивированных клеток памяти были выявлены три доминантно-активных варианта ТКР α : при специфической антигенной стимуляции клетками P815 Т-лимфоцитов, трансдуцированных ТКР α #2, ТКР α #5 и ТКР α #9, наблюдалось достоверное в 1,3 раза ($p < 0,05$) превышение уровня пролиферации по сравнению с пролиферацией в присутствии сингенных клеток EL-4 (рис. 4Б).

Таким образом, в ходе исследования было установлено, что репертуар первично активированных эффекторов содержит 10% целецентрических ТКР, тогда как доля таких рецепторов в репертуаре рестимулированных клеток памяти составляет 30%. Эта оценка предварительна

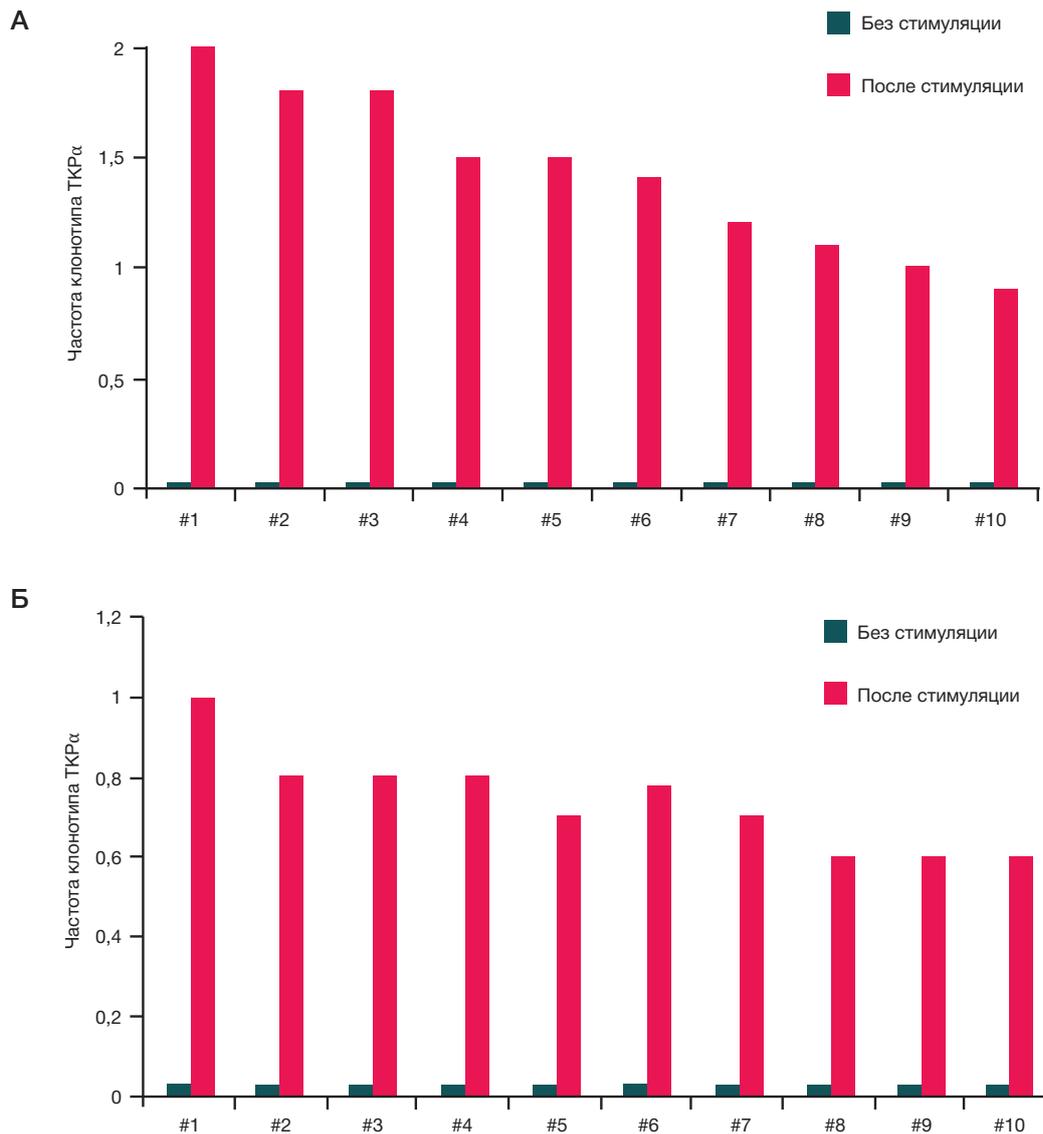


Рис. 3. Варианты α-цепей Т-клеточного рецептора, отобранные для скрининга *in vitro*. Частота встречаемости клонотипа α-цепи Т-клеточного рецептора в репертуаре эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ, (**А**) и рестимулированных Т-клеток памяти (**Б**)

и ее уточнение путем дальнейшего накопления данных продолжается.

В ходе скрининга *in vitro* были также выявлены отдельные варианты α-цепей ТКР (#9 в репертуаре первично активированных эффекторов (рис. 4А) и #1 в репертуаре рестимулированных Т-клеток памяти (рис. 4Б)), модификация которыми приводила к усиленной пролиферации Т-клеток в присутствии сингенной EL-4. Возможным объяснением этому может быть формирование рецептора с новой специфичностью в результате взаимодействия трансдуцированной α-цепи с эндогенной β-цепью ТКР в зрелом Т-лимфоците.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Используя ранее разработанную экспериментальную модель, мы проследили последовательные изменения в репертуаре ТКР мыши в ходе иммунного ответа на опухолевые аллоантигены, начиная с первичного ответа и заканчивая формированием иммунологической памяти и индукции вторичного ответа клеток памяти [8, 9]. Полученные данные показали, что ТКР с доминантно-активными α-цепями экспрессируют как первично активированные эффекторы,

так и рестимулированные Т-клетки памяти. Исходя из этого, можно предположить, что цепецентричность является врожденным свойством некоторых ТКР.

Интересную аналогию явлению можно найти в работе Dietrich et al., в которой исследовали преимунный репертуар Т-лимфоцитов, специфичных к меланома-ассоциированному аутоантигену melan-A. Было показано, что в melan-A-специфичных тимоцитах и зрелых периферических Т-клетках преимущественно используется определенный V-сегмент α-цепи (Vα 2.1) [12]. Таким образом, сужение репертуара в пользу использования данного варианта α-цепи происходит в ходе внутритимусной селекции melan-A-специфичных Т-клеток, хотя преимущественное использование ими данного варианта ТКРα не указывает на функциональное доминирование α-цепи. Мы полагаем, что причины этого явления могут заключаться в возможности повторных реаранжировок генов α-цепей ТКР в ходе позитивной селекции в тимусе, приводящих к отбору их вариантов, способных к установлению большего числа контактов с эндогенными комплексами МНС/пептид и тем самым к более эффективной позитивной селекции.

Стоит отметить, что в наших экспериментах доля цепецентрических рецепторов в репертуаре

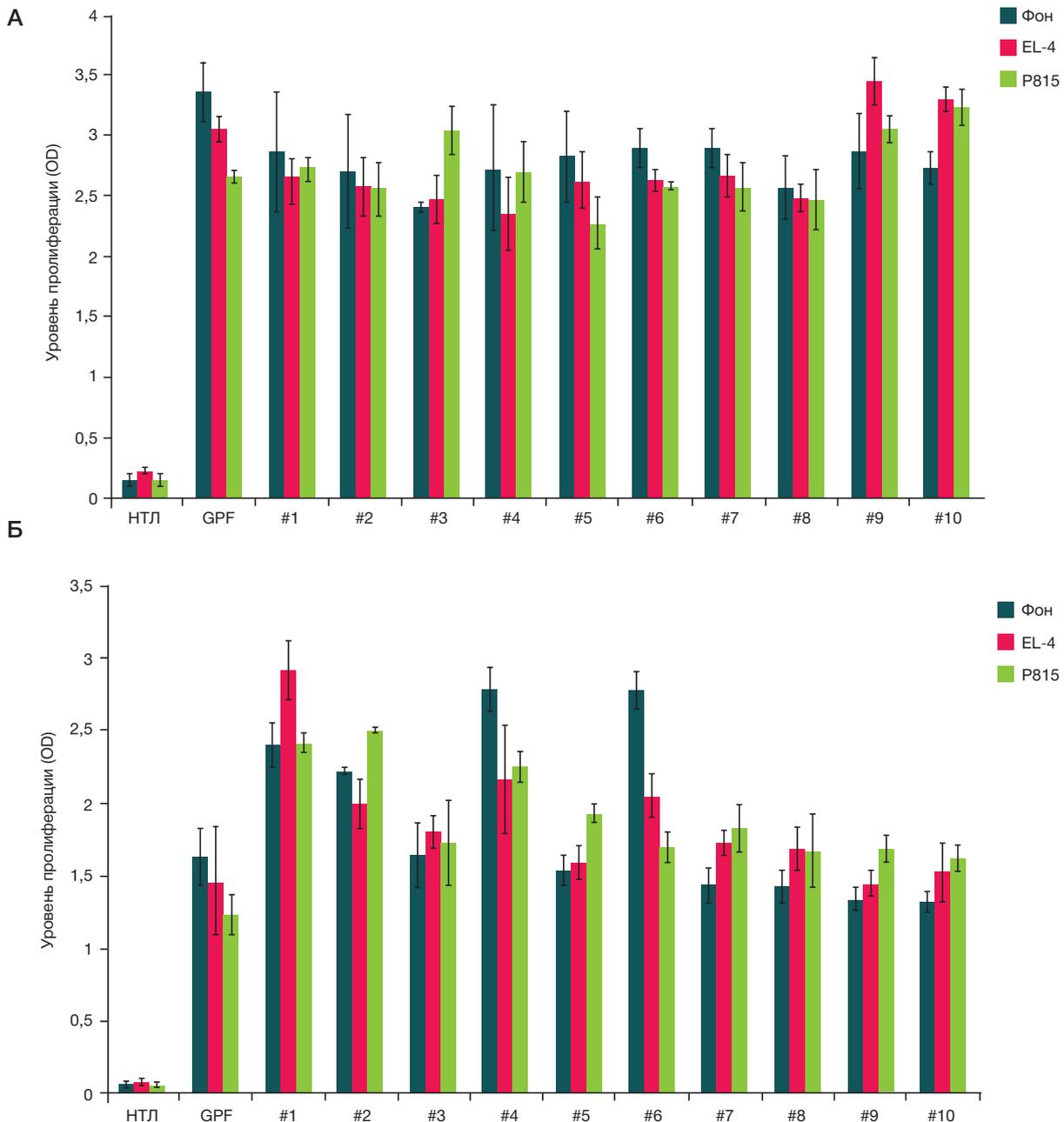


Рис. 4. Уровень антиген-индуцированной пролиферации *in vitro* Т-клеток, трансдуцированных индивидуальными вариантами α -цепи Т-клеточного рецептора (ТКР). Активированные Т-лимфоциты интактной мыши C57BL/6 трансдуцировали α -цепями ТКР из репертуара первично активированных эффекторов (**А**) или рестимулированных клеток памяти (**Б**). Модифицированные лимфоциты помещали в культуру с сингенными стимуляторами (клетки лимфомы EL-4) или аллогенными специфическими стимуляторами (клетки мастоцитомы P815) на 72 ч. Для оценки уровня фоновой пролиферации трансдуцированные Т-клетки культивировали без опухолевых клеток (фон). В качестве контроля использовали нетрансдуцированные активированные лимфоциты (НТЛ) и Т-клетки, модифицированные GFP. Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов как $m \pm SEM$ для трех технических повторов. * $p \leq 0,05$ (*t*-критерий Стьюдента)

реактивированных клеток памяти была выше (30% против 10% в репертуаре первично активированных эффекторов), что может указывать на селекцию клонов ТКР с доминантно-активными α -цепями в ходе вторичной специфической антигенной стимуляции. Биоинформатический анализ всего репертуара ТКР этих двух функциональных групп показал, что физико-химические характеристики ТКР α в пуле реактивированных клеток памяти существенно отличались от свойств α -цепей ТКР эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ [9]. Согласно полученным данным, во вторичном ответе репертуар ТКР обогащается рецепторами, содержащими α -цепь с повышенной силой

взаимодействия с МНС/пептидными комплексами и кросс-реактивностью [9].

Известно, что ТКР клеток памяти обладают повышенной аффинностью к антигену [13, 14]. Результаты наших исследований указывают на то, что это может быть обусловлено, в том числе, и экспрессией доминантно-активной ТКР α . Таким образом, отбор центрических ТКР может быть одним из механизмов созревания функциональной avidности антиген-примированных Т-клеток [15–17].

В свете имеющихся на сегодняшний день данных мы полагаем, что функционально истинные Т-клетки памяти могут быть наиболее перспективным источником

терапевтических ТКР. Ранее в экспериментальных моделях *in vivo* было показано, что доминантно-активные α -цепи цепецентрических ТКР клеток памяти можно успешно использовать для получения Т-клеточных продуктов для адоптивной иммунотерапии онкологических и инфекционных заболеваний [4, 7].

Описанную в данной работе систему скрининга *in vitro* можно также применять для оценки возможной аутореактивности модифицированных Т-клеток. При трансдукции индивидуальной α -цепи ТКР в Т-лимфоциты происходит ее связывание с эндогенно реаранжированными β -цепями, в результате чего может сформироваться рецептор с новой специфичностью, в том числе потенциально аутореактивный ТКР. Так, в нашем исследовании мы обнаружили повышенную пролиферативную активность Т-клеток, модифицированных двумя вариантами ТКР α , в присутствии сингенных стимуляторов (рис. 4А, #9; рис. 4Б, #1). Однако установление аутореактивности этих трансдуцированных Т-клеток выходило за рамки данной работы. Между тем, ранее мы показали, что Т-лимфоциты, модифицированные доминантно-активной ТКР α , не проявляют неспецифической цитотоксичности при адоптивном переносе сингенным реципиентам, что подтверждает отсутствие или низкую долю потенциально

аутореактивных клонов в полученном Т-клеточном продукте [18].

Выводы

В данном исследовании была разработана система скрининга *in vitro* цепецентрических ТКР мыши. С ее помощью идентифицированы доминантно-активные антиген-специфичные α -цепи в репертуаре эффекторов, вовлеченных в первичный иммунный ответ, и в репертуаре клеток памяти после вторичной специфической антигенной стимуляции. Результаты работы показали, что 10% ТКР первично активированных эффекторов являются цепецентрическими. Таким образом, данное свойство изначально присуще некоторым Т-клеточным рецепторам. При этом в ходе вторичного иммунного ответа доля таких рецепторов увеличивается в три раза, что может свидетельствовать об обогащении репертуара цепецентрическими ТКР вследствие антиген-индуцированной селекции клонотипов с такими рецепторами. Полученные данные позволят усовершенствовать процесс идентификации и отбора цепецентрических антиген-специфичных ТКР, которые являются привлекательным источником терапевтических рецепторов для адоптивной иммунотерапии.

Литература

1. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB. T Cell Receptor Chain Centricity: The Phenomenon and Potential Applications in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 15211.
2. Ochi T, Nakatsugawa M, Chamoto K, Tanaka S, Yamashita Y, Guo T, et al. Optimization of T-cell Reactivity by Exploiting TCR Chain Centricity for the Purpose of Safe and Effective Antitumor TCR Gene Therapy. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3: 1070–81.
3. Nakatsugawa M, Yamashita Y, Ochi T, Tanaka S, Chamoto K, Guo T, et al. Specific roles of each TCR hemichain in generating functional chain-centric TCR. *J Immunol.* 2015; 194: 3487–500.
4. Kalinina AA, Nesterenko LN, Bruter AV, Balunets DV, Chudakov DM, Izraelson M, et al. Adoptive Immunotherapy Based on Chain-Centric TCRs in Treatment of Infectious Diseases. *iScience.* 2020; 23 (12): 101854.
5. Brändle D, Brduscha-Riem K, Hayday AC, Owen MJ, Hengartner H, Pircher H. T cell development and repertoire of mice expressing a single T cell receptor alpha chain. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 2650–5.
6. Mori L, Loetscher H, Kakimoto K, Bluethmann H, Steinmetz M. Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 1992; 176: 381–88.
7. Zamkova MA, Kalinina AA, Silaeva YY, Persiyantseva NA, Bruter AV, Deikin AV, et al. Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR transgenic mice and in *in vitro* experiments. *Oncotarget.* 2019; 10: 4808–21.
8. Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogenic response by CD8+ memory cells. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 140 (5): 545–9.
9. Kalinina AA, Persiyantseva NA, Britanova OV, Lupyr K, Shagina I, Khromykh LM et al. Unique features of the TCR repertoire of reactivated memory T cells in the experimental mouse tumor model. *Comput Struct Biotechnol J.* 2023; 21: 3196–209.
10. Kalinina A, Bruter A, Nesterenko L, Khromykh L, Kazansky D. Generation of TCR α -transduced T cells for adoptive transfer therapy of salmonellosis in mice. *STAR Protoc.* 2021; 2 (1): 100368.
11. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB, Deykin AV, Silaeva YY. Suppression of the immune response by syngeneic splenocytes adoptively transferred to sublethally irradiated mice. *Acta Nat.* 2021; 13 (1): 116–26.
12. Dietrich PY, Le Gal FA, Dutoit V, Pittet MJ, Trautman L, Zippelius A, et al. Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen. *J Immunol.* 2003; 170: 5103–9.
13. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying individual T cell receptors of optimal avidity for tumor antigens. *Front Immunol.* 2015; 6: 582.
14. Mondino A, Manzo T. To remember or to forget: the role of good and bad memories in adoptive T cell therapy for tumors. *Front Immunol.* 2020; 11: 1915.
15. von Essen MR, Kongsbak M, Geisler C. Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 163453.
16. Giffillan CB, Hebeisen M, Rufer N, Speiser DE. Constant regulation for stable CD8 T-cell functional avidity and its possible implications for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2021; 51 (6): 1348–60.
17. Campillo-Davo D, Flumens D, Lion E. The quest for the best: how TCR affinity, avidity, and functional avidity affect TCR-engineered T-cell antitumor responses. *Cells.* 2020; 9(7): 1720.
18. Kalinina A, Bruter A, Persiyantseva N, Silaeva Y, Zamkova M, Khromykh L et al. Safety evaluation of the mouse TCR α - transduced T cell product in preclinical models *in vivo* and *in vitro*. *Biomed Pharmacother.* 2022; 145: 112480.

References

1. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB. T Cell Receptor Chain Centricity: The Phenomenon and Potential Applications in Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2023; 24: 15211.
2. Ochi T, Nakatsugawa M, Chamoto K, Tanaka S, Yamashita Y, Guo T, et al. Optimization of T-cell Reactivity by Exploiting TCR Chain Centricity for the Purpose of Safe and Effective Antitumor TCR

- Gene Therapy. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3: 1070–81.
3. Nakatsugawa M, Yamashita Y, Ochi T, Tanaka S, Chamoto K, Guo T, et al. Specific roles of each TCR hemichain in generating functional chain-centric TCR. *J Immunol.* 2015; 194: 3487–500.
 4. Kalinina AA, Nesterenko LN, Bruter AV, Balunets DV, Chudakov DM, Izraelson M, et al. Adoptive Immunotherapy Based on Chain-Centric TCRs in Treatment of Infectious Diseases. *iScience.* 2020; 23 (12): 101854.
 5. Brändle D, Brduscha-Riem K, Hayday AC, Owen MJ, Hengartner H, Pircher H. T cell development and repertoire of mice expressing a single T cell receptor alpha chain. *Eur J Immunol.* 1995; 25: 2650–5.
 6. Mori L, Loetscher H, Kakimoto K, Bluethmann H, Steinmetz M. Expression of a transgenic T cell receptor beta chain enhances collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 1992; 176: 381–88.
 7. Zamkova MA, Kalinina AA, Silaeva YY, Persiyantseva NA, Bruter AV, Deikin AV, et al. Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR transgenic mice and in in vitro experiments. *Oncotarget.* 2019; 10: 4808–21.
 8. Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogenic response by CD8+ memory cells. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 140 (5): 545–9.
 9. Kalinina AA, Persiyantseva NA, Britanova OV, Lupyr K, Shagina I, Khromykh LM et al. Unique features of the TCR repertoire of reactivated memory T cells in the experimental mouse tumor model. *Comput Struct Biotechnol J.* 2023; 21: 3196–209.
 10. Kalinina A, Bruter A, Nesterenko L, Khromykh L, Kazansky D. Generation of TCR α -transduced T cells for adoptive transfer therapy of salmonellosis in mice. *STAR Protoc.* 2021; 2 (1): 100368.
 11. Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB, Deykin AV, Silaeva YY. Suppression of the immune response by syngeneic splenocytes adoptively transferred to sublethally irradiated mice. *Acta Nat.* 2021; 13 (1): 116–26.
 12. Dietrich PY, Le Gal FA, Dutoit V, Pittet MJ, Trautman L, Zippelius A, et al. Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen. *J Immunol.* 2003; 170: 5103–9.
 13. Hebeisen M, Allard M, Gannon PO, Schmidt J, Speiser DE, Rufer N. Identifying individual T cell receptors of optimal avidity for tumor antigens. *Front Immunol.* 2015; 6: 582.
 14. Mondino A, Manzo T. To remember or to forget: the role of good and bad memories in adoptive T cell therapy for tumors. *Front Immunol.* 2020; 11: 1915.
 15. von Essen MR, Kongsbak M, Geisler C. Mechanisms behind functional avidity maturation in T cells. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 163453.
 16. Gilfillan CB, Hebeisen M, Rufer N, Speiser DE. Constant regulation for stable CD8 T-cell functional avidity and its possible implications for cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2021; 51 (6): 1348–60.
 17. Campillo-Davo D, Flumens D, Lion E. The quest for the best: how TCR affinity, avidity, and functional avidity affect TCR-engineered T-cell antitumor responses. *Cells.* 2020; 9(7): 1720.
 18. Kalinina A, Bruter A, Persiyantseva N, Silaeva Y, Zamkova M, Khromykh L et al. Safety evaluation of the mouse TCR α - transduced T cell product in preclinical models in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2022; 145: 112480.

ГЕНОФОНД УРАЛО-ПОВОЛЖЬЯ: ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИСТОРИЯ НАСЕЛЕНИЯ МОРДОВИИ ПО ДАННЫМ ФИЛОГЕОГРАФИИ ГАПЛОГРУППЫ N3A1-Y23475 Y-ХРОМОСОМЫ

А. Т. Агджоян¹ ✉, Д. С. Адамов¹, А. Ю. Потанина¹, М. М. Воронина¹, И. О. Горин¹, А. Г. Штрунов-Шлыков¹, С. М. Кошель², Е. В. Балановская¹, Г. Ю. Пономарёв¹

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

² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Показано, что Y-гаплогруппа N3a1-B211 распространена в популяциях финноязычных народов Урало-Поволжья. Целью исследования было изучение геногеографии и филогеографии самого западного варианта этой гаплогруппы: ветви N3a1-Y23475. При детальном генотипировании 395 носителей гаплогруппы N3a1-B211 из 29 популяций Восточной Европы, Урало-Поволжья и Сибири выявлено 78 носителей ее западной ветви, которая достигает максимальных частот в популяциях Мордовии (8% — у мокши, 9% — у эрзи, 25% — у теньгушевских эрзи-шокши). Низкие частоты N3a1-Y23475 в тюркоязычных и славянских популяциях могут указывать на роль финноязычного субстрата в их генофондах. По данным филогенетического анализа ветвь N3a1-Y23475 возникла 2,3–2,7 тыс. лет назад, но активное накопление ее современного разнообразия происходило преимущественно в популяциях Мордовии в течение последнего тысячелетия. Проведено генотипирование ДНК 74 носителей гаплогруппы N3a1-Y23475 по панели 37 Y-STR. Созданная филогенетическая сеть Y-STR гаплотипов указывает на два периода демографического роста у предков коренного населения Мордовии: около 1000 лет назад в популяциях праэрзи и прашокши, около 500 лет назад — в популяциях мокши и шокши. Выявленное наличие гаплогруппы N3a1-Y23475 у северных и южных алтайцев требует продолжения исследования. Положение северных алтайцев-кумандинцев на филогенетической сети предположительно отражает миграцию мордовского населения на Алтай в XIX–XX вв. Генетическая датировка для южных алтайцев-теленгитов может указывать на связь с прародиной гаплогруппы N3a1 в Южной Сибири до расселения ее древних носителей в Урало-Поволжье около 1,7 тыс. лет назад.

Ключевые слова: генофонд, геногеография, филогеография, Уральский регион, Мордовия, Y-хромосома, гаплогруппа N3a1-Y23475, генетические датировки TMRCA

Финансирование: Государственное задание Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра им. 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. Г. Штрунов-Шлыков — экспедиционное обследование популяций Мордовии; Г. Ю. Пономарёв, М. М. Воронина, Д. С. Адамов — генотипирование Y-SNP и Y-STR маркеров; А. Т. Агджоян, Г. Ю. Пономарёв, Д. С. Адамов, И. О. Горин, А. Ю. Потанина, С. М. Кошель — статистический, филогенетический, картографический анализ; Е. В. Балановская, А. Т. Агджоян — 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:** Анастасия Торосовна Агджоян
ул. Москворечье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; aagdzhojan@gmail.com

Статья получена: 10.12.2024 **Статья принята к печати:** 20.12.2024 **Опубликована онлайн:** 29.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.066

GENE POOL OF THE URAL-VOLGA REGION: GENETIC HISTORY OF MORDOVIA'S POPULATION BASED ON THE Y-CHROMOSOMAL HAPLOGROUP N3A1-Y23475 PHYLOGEOGRAPHY

Agdzhojan AT¹ ✉, Adamov DS¹, Potanina AY¹, Voronina MM¹, Gorin IO¹, Shtrunov-Shlykov AG¹, Koshel SM², Balanovska EV¹, Ponomarev GYu¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

It has been shown that Y-haplogroup N3a1-B211 is common in the Finnish-speaking peoples of the Ural-Volga region. The study aimed to investigate gene geography and phylogeography of the westernmost variant of this haplogroup: the N3a1-Y23475 branch. Comprehensive genotyping of 395 haplogroup N3a1-B211 carriers from 29 populations of Eastern Europe, Ural-Volga region, and Siberia revealed 78 carriers of its western branch reaching its maximum frequency in Mordovia's populations (8% in Moksha, 9% in Erzya, 25% in Tengushevsky Erzya-Shoksha). Low N3a1-Y23475 frequencies in the Turkic-speaking and Slavic populations suggest the role of the Finnish-speaking substrate in their gene pools. According to the phylogenetic analysis data, the N3a1-Y23475 branch emerged 2.3–2.7 thousand years ago, but active accumulation of its current diversity took place mainly in the populations of Mordovia during the last millennium. We performed DNA genotyping in 74 haplogroup N3a1-Y23475 carriers using the 37 Y-STR panel. The Y-STR haplotype phylogenetic network created suggests two periods of population growth in ancestors of Mordovia's indigenous population: about 1000 years ago in the populations of proto-Erzya and proto-Shoksha, about 500 years ago in the populations of Moksha and Shoksha. The fact of finding haplogroup N3a1-Y23475 in the Northern and Southern Altaians requires further research. Position of Northern Altaians-Kumandins in the phylogenetic network presumably reflects migration of Mordovia's population to Altai in the 19th–20th centuries. The age estimates reported for Southern Altaians-Telengits can indicate the association with the haplogroup N3a1 ancestral homeland in South Siberia before resettlement of its ancient carriers in the Ural-Volga region about 1.7 thousand years ago.

Keywords: gene pool, gene geography, phylogeography, Ural region, Mordovia, Y chromosome, haplogroup N3a1-Y23475, TMRCA estimates

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 (sample donors) and Biobank of North Eurasia (for access to DNA collections).

Author contribution: Balanovska EV — management; Shtrunov-Shlykov AG — expedition survey of the populations of Mordovia; Ponomarev GYu, Voronina MM, Adamov DS — Y-SNP and Y-STR marker genotyping; Agdzhojan AT, Ponomarev GYu, Adamov DS, Gorin IO, Potanina AY, Koshel SM — statistical, phylogenetic, cartographic analysis; Balanovska EV, Agdzhojan AT — 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:** Anastasia T. Agdzhojan
Moskvorechye, d. 1, 115522, Moscow, Russia; aagdzhojan@gmail.com

Received: 10.12.2024 **Accepted:** 20.12.2024 **Published online:** 29.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.066

Y-гаплогруппа N3 представляет один из базовых компонентов генофонда Северной Евразии и считается маркером экспансии древнего населения, в ходе которой распространился уральский язык [1–2]. Основная часть ареала гаплогруппы N3 приходится на территорию России, где на сегодняшний день проживает более 1,6 млн носителей языков уральской лингвистической семьи из 20 этнических групп [3]. Более 90% численности носителей уральских языков РФ представляют финноязычные народы Урало-Поволжья трех языковых групп: марийской (марийцы), мордовской (мокша, шокша, эрзя) и пермской (бесермяне, коми-зыряне, коми-пермяки, удмурты). Из трех самых частых в Европе ветвей гаплогруппы N3 (N3a1, N3a3, N3a4) только для гаплогруппы N3a1 показана самая высокая и значимая корреляция с уральской предковой компонентой аутосомного генома [4].

Гаплогруппа N3a1 распространена в генофондах народов Уральского региона и редка за его пределами: у удмуртов (67%), коми-зырян (18–43%), чувашей (20%), хантов и манси (19%), коми-пермяков (12%), марийцев (14%) и мордвы (5–10%) [1]. Распространение N3a1 отличается значительным размахом частоты в ее ареале: от 1% на периферии ареала (у башкир, белорусов, карел, русских, хакасов) до мирового максимума у удмуртов (67%). Данная гаплогруппа, как и другие линии N3, могла быть привнесена в Европу населением, связанным с сейминско-турбинским межкультурным феноменом в бронзовом веке, хотя эта гипотеза пока не подтверждена при прямом анализе палеодНК [5–6].

Структура гаплогруппы N3a1-B211, частой у финноязычных народов Урало-Поволжья, и датировки формирования ее ветвей изучены слабо, но общее представление о ней дают данные открытого ресурса YFull [7]. Среди участников коммерческого тестирования одной из частых в популяциях Урало-Поволжья является ветвь N3a1-Y23475, распространенная в западной части региона: у мордвы-эрзя, поволжских татар и русских (Брянской, Нижегородской, Пензенской, Кировской и Свердловской областей). Согласно данным YFull, активное накопление современного разнообразия внутри N3a1-Y23475 происходило в среднем за последние 2,4–2,7 тыс. лет.

Цель исследования — на основе обширных данных о популяциях народонаселения Северной Евразии изучить геногеографию и филогенетическую структуру гаплогруппы N3a1-Y23475.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Биологические образцы получены с письменного информированного согласия доноров в ходе экспедиционных обследований, проведенных под руководством профессора Е. В. Балановской и профессора РАН О. П. Балановского по единой программе, описанной ранее [8]. Донорами были неродственные мужчины, предки которых минимум на три поколения относили себя к данному этносу и родились в данной популяции. В Мордовии изучены этнические группы мокши и эрзи, в том числе обособленная группа эрзян-шокши Теньгушевского района, далее называемая как шокша.

Выделение ДНК из образцов венозной крови проводили с помощью станции выделения нуклеиновых кислот QIAasymphony SP или фенол-хлороформным методом с помощью протеиназы K, этапы пробоподготовки описаны ранее [9]. В общем массиве 4051 образцов

(табл. 1) выявлены 395 образцов носителей гаплогруппы N3a1-B211 из 29 популяций Восточной Европы, Урало-Поволжья и Сибири. Для них проведено генотипирование Y-SNP-маркера Y23475 методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-зондов и технологии OpenArray на амплификаторе QuantStudio 12 Flex (Thermo Fisher Scientific, США). Выявлено 78 носителей ветви N3a1-Y23475. Из них для 74 образцов с помощью коммерческих наборов Yfiler Plus (Thermo Fisher Scientific, США), Powerplex Y23 (Promega, США) и генетического анализатора «Нанофор 05» («Синтол», Россия) получены результаты фрагментного анализа (37 Y-STR-маркеров).

Картографический анализ проводили с помощью оригинального картографического пакета «GeneGeo» [10], разработанного под руководством Е. В. Балановской и О. П. Балановского. Геногеографическая карта распространения гаплогруппы N3a1-Y23475 построена на основе данных генотипирования методом средневзвешенной интерполяции с радиусом влияния 400 км и степенью убывания весовой функции 3.

Филогенетическая сеть N3a1-Y23475 построена по принципу median-joining (медианные сети) [11] с помощью программы Network v.10.2.0.0 (Fluxus Technology Ltd, Англия). Изображение сети визуализировано в программе Network Publisher v.2.1.2.5 (Fluxus Technology Ltd, Англия). Вес каждого из 37 Y-STR маркеров принят равным 10 с параметром $\epsilon = 0$. Расчет возраста ближайшего общего предка (TMRCA) для всей филогенетической сети и выделенных на ней кластеров (табл. 2) проведен методом ASD [12]. Исключен локус DYF387S1b из-за частичной AZFc-делеции в палиндроме P1 в образцах гаплогруппы N3-M178. Константа интенсивности мутаций для 36-маркерного гаплотипа выбрана по мировым данным [13–14] в размере 0,0038 на локус на поколение. Средний интервал одного мужского поколения принят как 31,5 года [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Геногеография гаплогруппы N3a1-Y23475

Ареал гаплогруппы N3a1-Y23475 простирается с северо-запада на юго-восток (от вологодских русских до монголов), но с прерывистым и неравномерным распределением частоты (табл. 1). Основная часть (84%) носителей гаплогруппы сосредоточена в финноязычных популяциях Урало-Поволжья, где частота N3a1-Y23475 варьирует от 0,4% до 25% (рис. 1). Наиболее высоких частот гаплогруппа достигает в популяциях Мордовии, где сосредоточено более 70% ее носителей со следующими значениями частоты: 8% — у мокши, 9% — у эрзи и максимум (25%) — у теньгушевских эрзи-шокши (далее — шокши). Почти на порядок реже N3a1-Y23475 встречается у соседних тюркоязычных народов: мишарей (2%), казанских татар (1%) и крайне редко — у башкир (0,4%). В русских популяциях гаплогруппа редка: 3% — в Вологодской области и по 1% — в Белгородской, Калужской, Орловской областях (табл. 1). В Сибири и Центральной Азии гаплогруппа N3a1-Y23475 обнаружена у алтайцев (6%), а также у одного монгола.

Выявленная геногеография гаплогруппы N3a1-Y23475 требует рассмотрения двух вопросов: 1) о факторах, приведших к ее накоплению в популяциях Мордовии; 2) об источниках ее появления у алтайцев. Поиск ответов на эти вопросы проведен с помощью филогенетического анализа.

Таблица 1. Распространение гаплогруппы N3a1-Y23475 в популяциях Урало-Поволжья и соседних регионов

Лингвистическая характеристика	Популяции	Общая выборка	Число изученных образцов N3a1	Число носителей ветви N3a1-Y23475	Частота ветви N3a1-Y23475, %
Русские популяции					
Славянская группа индоевропейской языковой семьи	русские Вологодской обл.	80	2	2	3
	русские Калужской обл.	96	1	1	1
	русские Белгородской обл.	341	2	2	1
	русские Орловской обл.	173	1	1	1
Урало-Поволжье					
Марийская группа уральской языковой семьи	мари горные	65	14	0	0
	мари луговые	161	33	0	0
Мордовская группа уральской языковой семьи	мордва мокша**	194	16	16	8
	мордва эрзя**	280	26	26	9
	мордва шокша**	52	13	13	25
Пермская группа уральской языковой семьи	бесермяне	45	20	0	0
	удмурты восточные	70	50	0	0
	удмурты северные	42	13	0	0
	удмурты южные	113	83	0	0
	коми зюздинские Кировской обл.	32	8	0	0
	коми-пермяки северные	74	7	0	0
	коми-пермяки юго-восточные	74	23	0	0
	коми-пермяки юго-западные	175	19	0	0
Тюркская ветвь алтайской языковой семьи	татары казанские	382	11	5	1
	татары мишари	154	12	3	2
	чуваша Татарстана	66	12	0	0
	башкиры Башкортостан	719	7	3	0,4
Сибирь и Центральная Азия					
Угорская группа уральской языковой семьи	ханты	83	5	0	0
	манси	76	1	0	0
Тюркская ветвь алтайской языковой семьи	сибирские татары	544	6	0	0
	алтайцы северные «кумандинцы»	44	1	1	2
	алтайцы северные «челканцы»	56	1	0	0
	алтайцы южные «теленгиты»	54	4	4	7
	тофалары	51	1	0	0
Монгольская ветвь алтайской языковой семьи	буряты Забайкальского края, (Дульдургинский р-н)	96	2	0	0
	монголы	636	1	1	0,2
Итого:		5028	395	78	

Примечание: ** — достоверные различия частот гаплогруппы между популяциями мордвы ($p < 0,01$)

Филогенетическая структура и датировки кластеров-ветвей

Для всех популяций, где встречена гаплогруппа N3a1-Y23475, изучены образцы ее носителей по панели 37 Y-STR маркеров. Суммарно получено 74 гаплотипа (табл. в приложении), на основе которых построена филогенетическая сеть (рис. 2).

Использование 37 Y-STR маркеров позволило достигнуть высокого филогенетического разрешения: основная часть гаплотипов распределилась в шесть кластеров (рис. 2). Четыре кластера (Б, В, Г, Д) характеризуются абсолютной специфичностью: каждый из них сформирован образцами только из одной этнической группы Мордовии — эрзи, мокши или шокши. Кластеры А и Е включают в себя три специфичных субкластера, два

из которых (А1 и Е1) также сформированы гаплотипами из популяций Мордовии. Для всех кластеров и субкластеров рассчитаны датировки их формирования (табл. 2 — возраст ближайшего общего предка, TMRCA).

Субкластеры А1 и кластер Б (рис. 2) мокши сформировались в один период — около 500 лет назад (табл. 2). Субкластер А1 включил четыре различных гаплотипа мокши из Инсарского района Мордовии (здесь и далее указаны места рождения дедов по отцу обследованных индивидов). Кластер Б представлен образцами мокши из трех соседних районов Мордовии: четыре образца — из Инсарского района, три — из Атюрьевского и один — из Ковылкинского.

Кластеры В и Д (рис. 2) эрзи сформировались около 900–1000 лет назад (табл. 2). Кластер В составляют

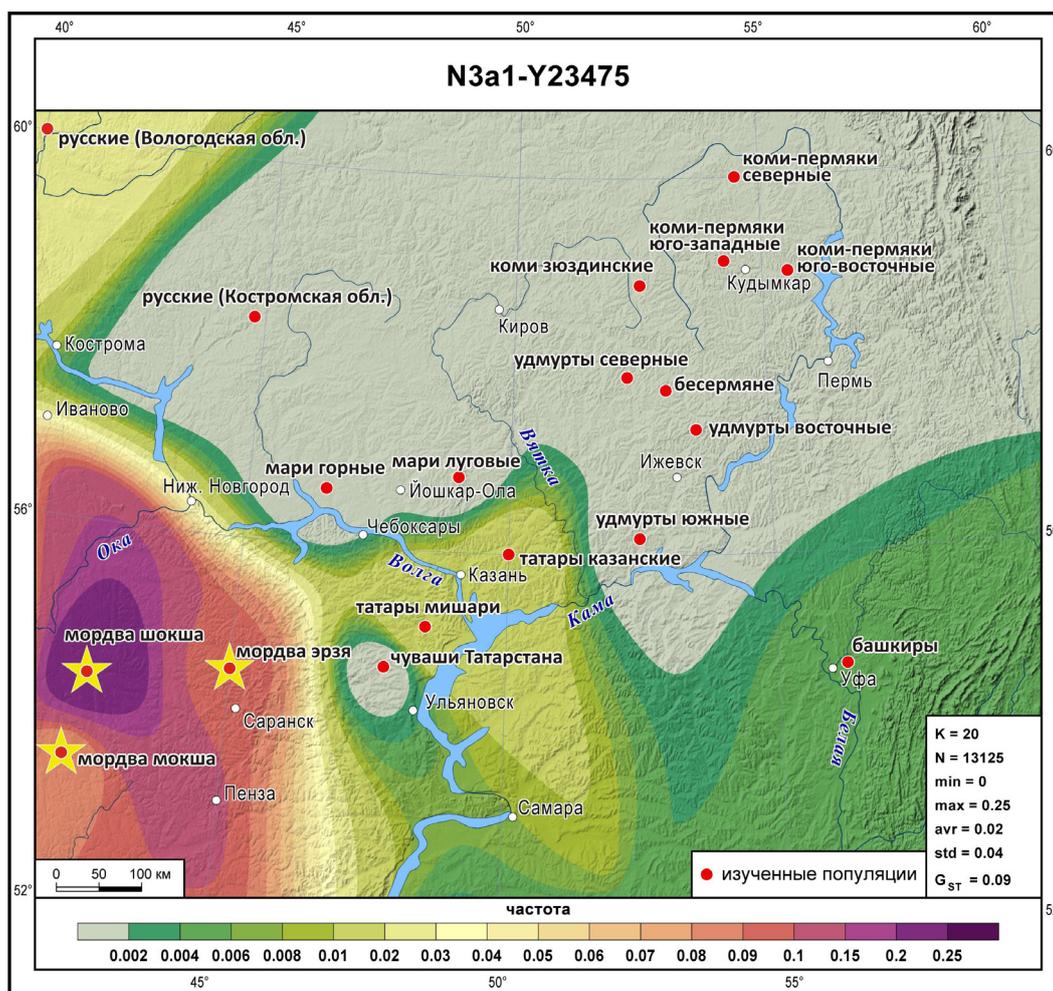


Рис. 1. Распространение гаплогруппы N3a1-Y23475 в популяциях коренного населения Урало-Поволжья. Красными точками обозначены изученные популяции, желтыми звездочками — популяции Мордовии. Частота гаплогруппы показана в соответствии с цветовой шкалой легенды карты

представители Ичалковского района Мордовии, кластер Д — преимущественно соседнего Чамзинского района.

Кластер Г и субкластер Е1 шокши удалены друг от друга на филогенетической сети, хотя все индивиды происходят из популяций Теньгушевского района на северо-западе Мордовии. При этом датировки различаются почти в два раза: субкластер Е1 сформировался около 500 лет назад, кластер Г — около 900 лет назад (табл. 2).

Все гаплотипы казанских татар и мишарей расположились вне кластеров. Отдаленное сходство с ними выявлено для двух образцов мокши и двух образцов башкир (рис. 2), а также субкластера Г шокши.

Образцы русских также не формируют отдельный субкластер, но при этом вошли в состав наиболее гетерогенного кластера Е вместе с гаплотипами мокши, башкира и монгола, а также субкластерами шокши и алтайцев-теленгитов.

Гаплотипы алтайцев на филогенетической сети распределились между кластерами А и Е. Датировка кластера А, включающего единственный образец северного алтайца-кумандинца, составляет около 1150 лет. Это значение в два раза превышает таковую для мокшанского субкластера А1, от которого и происходит алтайский гаплотип. Образцы южных алтайцев-теленгитов объединились в специфичный субкластер Е2, что указывает на их происхождение от единого предка. Возраст ближайшего общего предка для субкластера Е2 составляет около 800 лет (табл. 2).

Полученные нами результаты расчета возраста всей гаплогруппы N3a1-Y23475 по Y-STR гаплотипам (2340 ± 330 лет) в пределах погрешности согласуются с оценкой коллектива YFull [7], полученной по Y-SNP-маркерам (2700 ± 300 лет). Для половины Y-STR кластеров, выявленных при популяционном изучении, можно найти соответствие на филогенетическом древе YFull (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выявленное накопление гаплогруппы N3a1-Y23475 в генофондах населения Мордовии и два импульса роста численности отражают их демографическую историю. Рост численности около 500 лет назад может быть связан с освобождением населения от системы зависимости от Монгольской империи и Золотой орды (длившейся с середины XIII до конца XV в.). Импульс роста численности около 1000 лет назад связывается с этапом оформления в X в. этнических очагов мокши (на Цне и в Присурье) и эрзи (в Потешье). Поздние рязанско-окские традиции, прослеживаемые по керамическому комплексу Шокшинского могильника, развивались в ареале шокши изолированно, наследуя и развивая черты керамики предшествующего времени [16].

Своеобразие генофонда шокши прослеживается как по высокой частоте N3a1-Y23475 (25% при 8–9% у мокши и эрзи), так и при анализе аутосомного генофонда. Метод ADMIXTURE выявил две предковые компоненты [17]. Одна

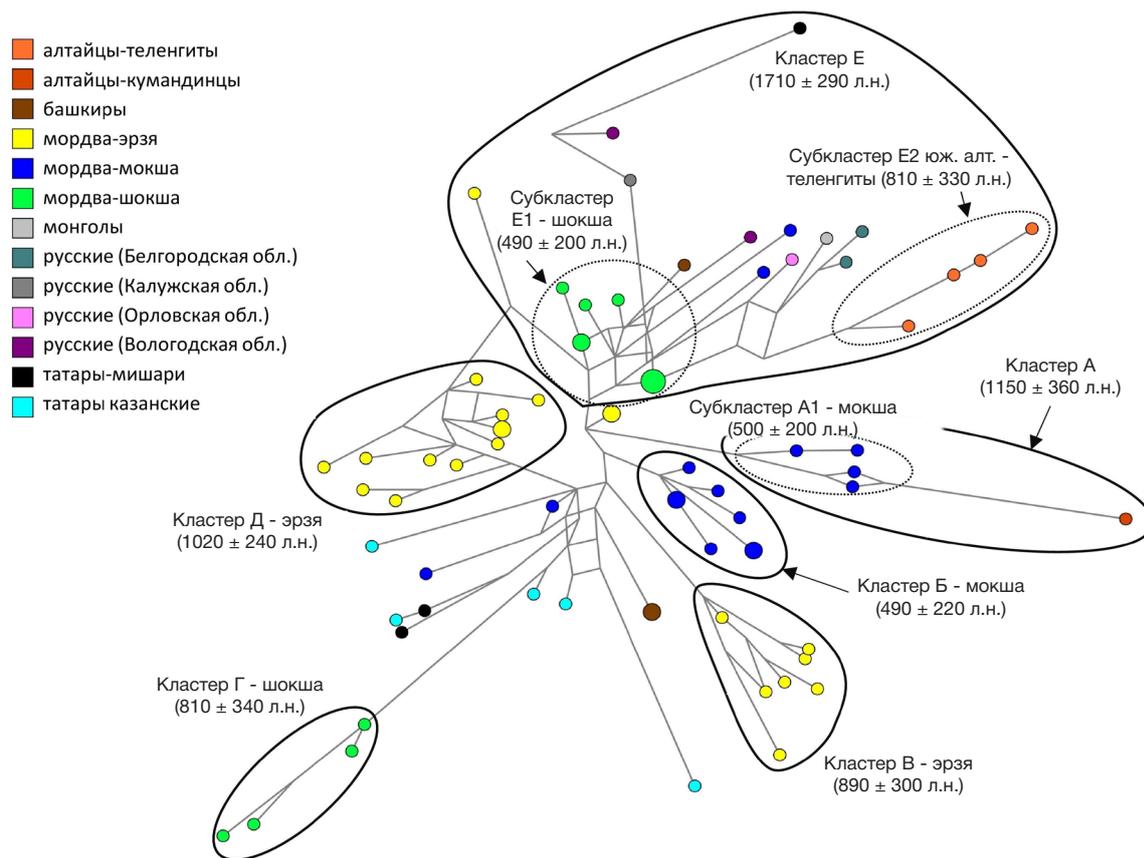


Рис. 2. Филогенетическая сеть гаплогруппы N3a1- Y23475

предковая компонента («Мокша-Эрзя») объединяет только популяции мокши и эрзи, вторая («Шокша») — характерна только для популяций шокши. Обе предковые компоненты встречаются в геномах большинства русских популяций, указывая на вклад дославянского населения в русский генофонд (табл. 3).

Накопление гаплогруппы N3a1-Y23475 в народонаселении Мордовии можно объяснить последовательным действием двух факторов: миграции и эффекта основателя. Присутствие этой линии во всех мордовских популяциях указывает на ее наследование прапопуляцией мордвы из единого источника — вероятно, пришлых носителей гаплогруппы N3a1. Действие эффекта основателя предположительно проявилось уже после обособления этнических групп Мордовии. Это объясняет высокую

специфичность кластеров и субкластеров (накопление гаплотипического разнообразия в пределах каждой популяции) и их структуру на филогенетической сети (рис. 2).

Дать предварительный ответ на вопрос об источниках появления гаплогруппы N3a1-Y23475 у алтайцев позволяют результаты филогенетического анализа N3a1-Y23475. Гаплотип северного алтайца-кумандинца наиболее близок к мокшанским (рис. 2, кластер А). Поскольку численность кумандинцев мала (2400 человек), единичная линия мокши могла появиться у них в результате массового расселения мордвы на Алтай в XIX–XX вв. [18]: в Алтайском крае в начале XX в. по численности мордва являлась третьим (после русских и украинцев) этносом.

Вопрос о популяции-источнике ветви N3a1-Y23475 у южных алтайцев связан с вопросом об ее прародине,

Таблица 2. Генетические датировки (TMRCA) кластеров гаплогруппы N3a1-Y23475

Кластер	<i>n</i>	TMRCA, лет до н.в.	Оценка YFull	Соответствие Y-STR кластера и ветви на дереве YFull
А (мокша и алтаец-кумандинец)	5	1150 ± 360		не выявлено
А1 (мокша)	4	500 ± 200		не выявлено
Б (мокша)	8	490 ± 220	800 ± 210	N-BY9737
В (эрзя)	7	890 ± 300	1400 ± 260	N-Y164241
Г (шокша)	4	810 ± 340		не выявлено
Д (эрзя)	12	1020 ± 240		не выявлено
Е	25	1710 ± 290	1250 ± 260	N-Y39435
Е1 (шокша)	9	490 ± 200	425 ± 110	N-Y39282
Е2 (алтайцы-теленгиты)	4	810 ± 330		не выявлено
N3a1-Y23475 в целом	74	2340 ± 330	2700 ± 300	N-Y23472

Примечание: *n* — число образцов, составляющих кластер, TMRCA (time to the most recent common ancestor) — возраст ближайшего общего предка.

Таблица 3. Доля индивидуальных аутосомных геномов (%) в русских популяциях, в которых присутствуют предковые компоненты ADMIXTURE, характерные для мокши и эрзи («Мокша-Эрзя») и для шокши («Шокша»)

Области русского населения	Доля предковых компонент Мордовии в русских популяциях	
	«Мокша-Эрзя» (в %)	«Шокша» (в %)
Тверская	90	50
Калужская	80	60
Смоленская	60	50
Орловская	65	25
Тамбовская	50	40
Костромская	50	80
Рязанская	50	80
Нижегородская	45	80

которая гипотетически могла располагаться или в Уральском регионе («Уральская прародина»), или в Южной Сибири («Сибирская прародина»).

Южные алтайцы-теленгиты образуют на филогенетической сети собственный субкластер E2, который вместе с двумя белгородскими образцами и монгольским восходит к самому частому гаплотипу шокши (рис. 2, кластер E). Датировка субкластера E2 указывает на возможность появления предка современных носителей ветви N3a1-Y23475 в ареале южных алтайцев-теленгитов около 800 лет назад (в интервале от 500 до 1100 лет назад).

Предпосылки гипотезы «Уральская прародина». Наибольшее разнообразие и кластеров, и единичных гаплотипов N3a1-Y23475 наблюдается в современных популяциях Урало-Поволжья, что косвенно указывает на возможность происхождения гаплогруппы на этой территории. В таком случае появление гаплогруппы N3a1-Y23475 у южных алтайцев и монголов связано с миграциями из Уральского региона на восток. При этом миграция на Алтай должна была происходить не позднее 500 лет назад, поскольку субкластер E2 значительно обособлен от основного пула гаплотипов из популяций Урало-Поволжья.

Предпосылки гипотезы «Сибирская прародина». Альтернативная гипотеза помещает прародину гаплогруппы N3a1-Y23475 в Южную Сибирь. В пользу этой гипотезы свидетельствует ранее показанный общий вектор распространения гаплогруппы N с востока на запад [1]. В этом случае субкластер E2 южных алтайцев-теленгитов сохраняет генетическую память о древних носителях гаплогруппы N3a1-Y23475, мигрировавших из Южной Сибири в Уральский регион. Кластер E отличается от остальных на филогенетической сети (рис. 2) самой высокой популяционной гетерогенностью и наиболее древней датировкой (1710 ± 290 лет назад; табл. 2). В структуре кластера E прослеживается значительное число ретикуляций, а между гаплотипами из разных регионов и обоими субкластерами — достаточно отдаленные взаимосвязи. Рассчитанные датировки указывают на формирование кластера E в среднем лишь на 600 лет позже, чем всей гаплогруппы N3a1-Y23475. Оба эти наблюдения указывают на существование в прошлом многих субкластеров внутри кластера E, от

которых сохранились в современности только отдельные гаплотипы.

Гипотезе о южносибирской прародине гаплогруппы N3a1-Y23475 не противоречит характер ее распространения в современных популяциях, поскольку высокая частота и гаплотипическое разнообразие в популяциях Мордовии сформировались лишь за последнюю тысячу лет. Датировка кластера E косвенно указывает на общий корень и южносибирских, и части поволжских, и всех русских популяций около 1700 лет назад. В этот период N3a1-Y23475 могла появиться в Южной Сибири в популяции носителей гаплогруппы N3a1-B211, мигрировавших на запад. Основатель субкластера E2 может являться потомком этого населения, оставившего редкий след в генофонде современных южных алтайцев-теленгитов.

Имеющиеся данные пока не дают однозначного подтверждения справедливости той или иной гипотезы. Поэтому планируется провести анализ всего комплекса гаплогрупп и гаплотипов Y-хромосомы с целью проследить генетические связи генофондов Уральского региона и Южной Сибири.

Выводы

Гаплогруппа N3a1-Y23475 сформировалась в период 2,3–2,7 тыс. лет назад, но ее активное накопление происходило преимущественно в популяциях Мордовии в период с X в. Высокая доля гаплогруппы во всех мордовских популяциях указывает на ее общий для них источник. Прослеживаются два импульса роста численности предков мордвы: около 1000 лет назад — у эрзи, около 500 лет назад — у мокши, а в популяции шокши зафиксированы оба импульса. Невысокая частота N3a1-Y23475 в популяциях тюркоязычных и славянских народов связана с субстратным пластом финноязычных народов в их генофондах. Наличие гаплогруппы N3a1-Y23475 у северных алтайцев-кумандинцев предположительно связано с миграцией мордовского населения на Алтай в XIX–XX вв. Источник N3a1-Y23475 у южных алтайцев-теленгитов требует проверки двух гипотез: «Уральской прародины» с незначительными миграциями на восток и «Сибирской прародины» с миграцией из Южной Сибири в Урало-Поволжье около 1700 лет назад.

Литература

1. 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.
2. Lamnidis TC, Majander K, Jeong C, Salmela E, Wessman A, Moiseyev V, et al. Ancient Fennoscandian genomes reveal origin and spread of Siberian ancestry in Europe. *Nature Communications*. 2018; 9 (1): 5018.
3. Итоги Всероссийской переписи населения 2020 года. Том 5 Национальный состав и владение языками. Таблица 1. Национальный состав населения (дата обращения: 10 November 2024). Доступно по ссылке: https://rosstat.gov.ru/vpn/2020/Tom5_Nacionalnyj_sostav_i_vladenie_yazykami.
4. 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 Biol*. 2018; 19 (1): 139.
5. Zeng TC, Vyazov LA, Kim A, Flegontov P, Sirak K, Maier R, et al. Postglacial genomes from foragers across Northern Eurasia reveal prehistoric mobility associated with the spread of the Uralic and Yeniseian languages. *bioRxiv*. 2023.
6. Childebayeva A, Fricke F, Rohrlach AB, Huang L, Schiffels S, Vesakoski O, et al. Bronze age Northern Eurasian genetics in the context of development of metallurgy and Siberian ancestry. *Communications Biology*. 2024; 7 (1): 723.
7. Tree YTree v12.03.00 (дата обращения: 20 November 2024). Доступно по ссылке: <https://www.yfull.com/sc/tree/>.
8. Балановская Е. В., Жабалин М. К., Аджоян А. Т., Чухряева М. И., Маркина Н. В., Балаганская О. А. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. *Генетика*. 2016; 52 (12): 1371–87.
9. Agdzhoyan A, Iskandarov N, Ponomarev G, Pylev V, Koshel S, Salaev V, et al. Origins of East Caucasus Gene Pool: Contributions of Autochthonous Bronze Age Populations and Migrations from West Asia Estimated from Y-Chromosome Data Genes. 2023; 14 (9): 1780.
10. Кошель С. М. Геоинформационные технологии в геногеографии. В книге: И. К. Лурье, В. И. Кравцова, редакторы. Современная географическая картография. М.: Дата+, 2012; с. 158–66.
11. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999; 16 (1): 37–48.
12. Zhivotovsky LA, Underhill PA, Cinnioglu C, Kayser M, Morar B, Kivisild T, et al. The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time. *American Journal of Human Genetics*. 2004; 1: 50–61.
13. Willuweit S, Roewer L. The new Y Chromosome Haplotype Reference Database. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 15: 43–48.
14. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *American Journal of Human Genetics*. 2010; 87 (3): 341–53.
15. Fenner J. Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *American Journal of Physical Anthropology*. 2005; 128 (2): 415–23.
16. Гришаков В. В. Керамика погребальных памятников Окско-Сурского Междуречья в I тыс. н.э. [диссертация]. М., 1993.
17. Балановская Е. В., Горин И. О., Пonomarev Г. Ю., Пылёв В. Ю., Петрушенко В. С., Маркина Н. В. и др. Следы взаимодействия финноязычного, славянского и тюркоязычного населения в современном генофонде и их отражение в фармакогенетике. *Вестник РГМУ*. 2022; 2: 20–9.
18. Овчарова М. А. Мордва Алтая: история и этнокультурные процессы (XIX — начало XXI в.) [диссертация]. Барнаул, 2009.

References

1. 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.
2. Lamnidis TC, Majander K, Jeong C, Salmela E, Wessman A, Moiseyev V, et al. Ancient Fennoscandian genomes reveal origin and spread of Siberian ancestry in Europe. *Nature Communications*. 2018; 9 (1): 5018.
3. All-Russian Population Census 2020. Volume 5 National composition and language proficiency. Table 1. National composition of the population (cited 10 November 2024) Available from: https://rosstat.gov.ru/vpn/2020/Tom5_Nacionalnyj_sostav_i_vladenie_yazykami.
4. 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 Biol*. 2018; 19 (1): 139.
5. Zeng TC, Vyazov LA, Kim A, Flegontov P, Sirak K, Maier R, et al. Postglacial genomes from foragers across Northern Eurasia reveal prehistoric mobility associated with the spread of the Uralic and Yeniseian languages. *bioRxiv*. 2023.
6. Childebayeva A, Fricke F, Rohrlach AB, Huang L, Schiffels S, Vesakoski O, et al. Bronze age Northern Eurasian genetics in the context of development of metallurgy and Siberian ancestry. *Communications Biology*. 2024; 7 (1): 723.
7. Tree YTree v12.03.00 (cited 20 November 2024). Available from: <https://www.yfull.com/sc/tree/>.
8. Balanovska EV, Agdzhoyan AT, Chukhryaeva MI, Skhalyakho RA, Zaporozhchenko VV, Romanov AG, et al. Population biobanks: organizational models and prospects of application in gene geography and personalized medicine. *Russian Journal of Genetics*. 2016; 52 (12): 1371–87.
9. Agdzhoyan A, Iskandarov N, Ponomarev G, Pylev V, Koshel S, Salaev V, et al. Origins of East Caucasus Gene Pool: Contributions of Autochthonous Bronze Age Populations and Migrations from West Asia Estimated from Y-Chromosome Data Genes. 2023; 14 (9): 1780.
10. Koshel SM. Geoinformacionnye tehnologii v genogeografii. V knige: Sovremennaja geograficheskaja kartografija. M.: Data+, 2012; s. 158–166. Russian.
11. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 1999; 16 (1): 37–48.
12. Zhivotovsky LA, Underhill PA, Cinnioglu C, Kayser M, Morar B, Kivisild T, et al. The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time. *American Journal of Human Genetics*. 2004; 1: 50–61.
13. Willuweit S, Roewer L. The new Y Chromosome Haplotype Reference Database. *Forensic Science International: Genetics*. 2015; 15: 43–48.
14. Ballantyne KN, Goedbloed M, Fang R, Schaap O, Lao O, Wollstein A, et al. Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. *American Journal of Human Genetics*. 2010; 87 (3): 341–53.
15. Fenner J. Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *American Journal of Physical Anthropology*. 2005; 128 (2): 415–23.
16. Grishakov V. V. Keramika pogrebal'nykh pamyatnikov Oksko-Surskogo Mezhdurech'ya v I tys. n.e. [dissertation]. M., 1993. Russian.
17. Balanovska EV, Gorin IO, Ponomarev GY, Pylev VY, Petrusenko VS, Markina NV, et al. Footprints of interaction among Finnic-speaking, Slavic, and Turkic-speaking populations in modern gene pool and their reflection in pharmacogenetics. *Bulletin of RSMU*. 2022; 2: 18–27.
18. Ovcharova MA. Mordva Altaya: istoriya i etnokul'turnye protsessy (XIX - nachalo XXI v.) [dissertation]. Barnaul, 2009. Russian.

ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИМИ СТЕЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Я. М. Валиева¹, К. В. Попов² ✉

¹ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Москва, Россия

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

По тактике доставки терапевтических конструкций генную терапию разделяют на *in vivo* и *ex vivo*. При терапии *in vivo* вектор, содержащий терапевтическую конструкцию, вводят пациенту. При терапии *ex vivo* клетки извлекают из организма пациента, подвергают генетической модификации и возвращают обратно. В *ex vivo* терапии наследственных заболеваний модификации чаще всего подвергаются гемопоэтические стволовые клетки. Несмотря на преимущество терапии *in vivo*, состоящее в возможности масштабирования производства и удобства применения готового препарата, для ряда генетических заболеваний сохраняется актуальность терапии на основе трансплантации генетически модифицированных гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, генная клеточная терапия *ex vivo*, генная терапия *in vivo*, лизосомные болезни накопления, генные болезни

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 123020800103-6.

Вклад авторов: Я. М. Валиева — анализ литературы, сбор данных, написание рукописи. К. В. Попов — идея рукописи, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Константин Васильевич Попов
ул. Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; popov_konst@mail.ru

Статья получена: 25.12.2024 **Статья принята к печати:** 29.12.2024 **Опубликована онлайн:** 31.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.074

PROSPECTS OF GENE THERAPY WITH HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Valieva YM¹, Popov KV² ✉

¹ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow, Russia

² Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Gene therapy is subdivided into *in vivo* and *ex vivo* according to the tactics of delivery of therapeutic constructions. *In vivo* therapy, a vector containing a therapeutic construction is injected into the patient. In *ex vivo* therapy, cells are removed from the patient's body, genetically modified, and then returned. In *ex vivo* therapy for inherited diseases, hematopoietic stem cells are most often subjected to modification. Despite the advantage of *in vivo* therapy, which consists in the possibility of scale-up of production and convenience of use of ready-to-use drug, therapy based on transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells remains relevant for a number of genetic diseases.

Keywords: hematopoietic stem cells, *ex vivo* gene therapy, *in vivo* gene therapy, lysosomal storage diseases, genetic disorder

Funding: the paper was executed within the framework of the State Assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 123020800103-6.

Author contribution: Valieva YM — literature review, data acquisition, manuscript writing; Popov KV — manuscript concept, editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Konstantin V. Popov
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; popov_konst@mail.ru

Received: 25.12.2024 **Accepted:** 29.12.2024 **Published online:** 31.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.074

Согласно определению, терапевтическое действие геннотерапевтического лекарственного препарата обусловлено последовательностью рекомбинантной нуклеиновой кислоты, входящей в его состав, или продуктом экспрессии такой последовательности [1]. В зависимости от молекулярного механизма, лежащего в основе заболевания, терапия может быть направлена на исправление генных дефектов или придание клеткам новых свойств. Тактика в отношении функции поврежденного гена может состоять в добавлении рабочей копии, подавлении экспрессии или исправлении последовательности. Добавление рабочей копии применяют для аутосомно-рецессивных заболеваний. Подавление экспрессии поврежденного гена — для аутосомно-доминантных [2]. С развитием методов геномного редактирования исправление последовательности поврежденного гена рассматривается как приоритетное направление разработки препаратов для лечения заболеваний и с аутосомно-рецессивным, и с аутосомно-доминантным типами наследования. Действие CAR-T-терапии, наиболее широко используемого в клинической практике геннотерапевтического препарата,

основано на придании клеткам новых свойств, в данном случае введении химерного рецептора, позволяющего распознавать и уничтожать опухолевые клетки [3].

Актуальные методы генной терапии

Вне зависимости от механизма реализации терапевтического действия нуклеиновой кислоты, содержащейся в генотерапевтическом препарате, ключевым для разработки технологии производства препарата является выбор между *in vivo* и *ex vivo* доставкой терапевтической конструкции в клетки-мишени. В варианте *in vivo* применения препарат, содержащий вектор, вводят непосредственно в организм пациента. Для *ex vivo* применения из организма пациента выделяют клетки, подвергают генетической модификации и возвращают пациенту.

На сегодняшний день использование вирусных векторов — наиболее изученный способ доставки гена в клетку. Вирусы используют для таргетной доставки необходимого генетического материала в клетки *in vivo* и *ex vivo*. Лидерами среди переносчиков модифицированных

генов являются аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы и лентивирусные векторы. AAV-векторы преимущественно используют *in vivo*, в то время как лентивирусные — для *ex vivo* терапии [4, 5].

РНК-методы в генной терапии представляют собой быстро развивающуюся область со значительным потенциалом для лечения различных заболеваний. Эти методы включают терапию с использованием антисмысловых олигонуклеотидов, РНК-интерференции и матричной РНК (мРНК). Развитие невирусных систем доставки РНК, в частности на основе инкапсуляции в липидные наночастицы, позволит в перспективе обходиться без вирусных систем доставки и избежать рисков, связанных с реакцией иммунной системы на вирусные белки и с неконтролируемой интеграцией трансгенов в геном клеток пациента [6].

Прорывной технологией стала разработка нового метода геномного редактирования CRISPR/Cas9. CRISPR/Cas9 можно использовать для коррекции генетических мутаций путем точного редактирования дефектного гена. Этот подход особенно актуален для моногенных заболеваний, когда за заболевание отвечает точечная мутация гена [7].

Генная терапия *in vivo* обладает конкурентным преимуществом в большинстве случаев благодаря возможности создания готовых лекарственных препаратов, адаптированных под основную когорту пациентов. Этим обуславливаются легкость масштабирования, снижение цены за единицу продукции и готовность к применению по требованию.

Генная терапия *ex vivo*, в основном, представлена в лечении онкологических заболеваний (в этом случае модификации подвергают иммунные клетки) и в лечении наследственных заболеваний генетически модифицированными гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК). ГСК являются оптимальными клетками-мишенями для терапевтического изменения генома благодаря их способности самообновляться и дифференцироваться. Таким образом обеспечиваются длительный уровень экспрессии терапевтической конструкции и доставка продуктов ее экспрессии в дифференцированные клетки, в большую часть организма. Кроме того, ГСК не несут риска иммуногенности, связанного с непосредственным применением высоких доз вирусных векторов *in vivo* [8].

Генная терапия на основе гемопоэтических стволовых клеток

Методика *ex vivo* генной терапии гемопоэтическими стволовыми клетками (ГСК ГТ) — многоступенчатый процесс. Сначала клетки ГСК забирают у пациента, затем их культивируют, подвергают генетической модификации, и модифицированные клетки вводят снова пациенту. Введенные клетки заселяют нишу ГСК в костном мозге [9]. ГСК ГТ *ex vivo* представляется перспективным подходом для лечения моногенных генетических заболеваний, включающих первичные иммунодефициты, гемоглобинопатии и лизосомные болезни накопления.

Наиболее успешный пример ГСК ГТ — зарегистрированный в 2020 г. геннотерапевтический препарат для лечения метахроматической лейкодиетрофии (МЛД) — Libmeldy. Препарат представляет собой аутологичные ГСК, трансдуцированные лентивирусным вектором, несущим функциональную копию гена ARSA. Результаты лечения показали наличие хорошего терапевтического эффекта

и длительной продолжительности действия препарата [10]. Использование векторов на основе лентивирусов обеспечивает стабильную интеграцию генетической конструкции в геном, высокую и длительную экспрессию гена. Однако при использовании вирусных векторов для модификации ГСК возникает риск инсерционного мутагенеза. Так при попытке лечения X-сцепленного тяжелого комбинированного иммунодефицита (X-SCID) аналогичным препаратом на основе ГСК ГТ был выявлен повышенный риск развития Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза. Несмотря на усилия, направленные на изменения дизайна лентивирусных векторов с целью снижения риска развития онкологических заболеваний вследствие интеграции трансгена, были выявлены аналогичные осложнения при применении препарата для лечения адренолейкодистрофии [11]. Повышение безопасности модифицированных ГСК может быть достигнуто использованием невирусных систем доставки на основе транспозонов и систем редактирования генома на основе CRISPR/Cas-систем.

Преимущество *ex vivo* ГСК ГТ в сравнении с *in vivo* терапией на основе вирусных векторов состоит в отсутствии необходимости использовать высокие дозы вектора и подвергать этим самым пациента риску развития иммунных реакций. В частности, при использовании AAV-векторов вследствие эффекта первого прохождения значительная часть частиц остается в печени. Другими словами, если целевой орган-мишень отличен от печени, то AAV векторы его не достигают в нужной терапевтической дозе, а использование более высоких доз оказывает гепатотоксический и иммуногенный эффекты [12]. Так как при ГСК ГТ используют аутологичные клетки пациента, иммуногенность данных препаратов минимальна. Трансплантация ГСК со стабильной интеграцией генотерапевтической конструкции обеспечивает длительный, теоретически пожизненный, терапевтический эффект. В случае болезней кроветворения, таких как синдром Вискотта–Олдрича и других первичных иммунодефицитов, ГСК сами являются целевыми клетками. ГСК способны проникать через гематоэнцефалический барьер, дифференцироваться в макрофаги, занимая нишу микроглии, и экспрессировать необходимые ферменты в тканях головного мозга [13]. Этим объясняется эффект от трансплантации аллогенных ГСК от здорового донора для терапии группы наследственных заболеваний, обусловленных повреждением нервных клеток головного мозга, включающих мукополисахаридозы, адренолейкодистрофию, метахроматическую лейкодиетрофию. Тот же эффект достигается при использовании аутологичных ГСК с исправленным генным дефектом.

Улучшение методов культивирования ГСК *ex vivo* позволяет получить значительно больше ГСК для модификации, чем доступно при непосредственном использовании клеток, собранных у пациента. Высокие дозы ГСК, используемых для трансплантации, позволяют надеяться на введение в практику протоколов трансплантации модифицированных ГСК, не требующих генотоксичных режимов кондиционирования. В настоящее время для достижения клинического эффекта от трансплантации ГСК требуется предварительное миелоаблятивное кондиционирование с помощью химиотерапии, направленной на подавление костного мозга пациента. Такое кондиционирование несет как краткосрочные риски, связанные с развитием инфекционных заболеваний, так и отдаленные риски нарушения роста, интеллектуального развития, потери фертильности, развития других заболеваний

[14]. В настоящее время разрабатываются протоколы формирования ниши ГСК с использованием конъюгатов антител, специфичных к ГСК с токсинами.

Сегодня самый дорогой препарат в мире — препарат Lentimeldy на основе ГСК для лечения метахроматической лейкоциклопозии [15]. В силу использования для производства препарата клеток пациента отсутствует возможность снижения стоимости дозы препарата увеличением объема производимой партии. Кроме того, *ex vivo* применение требует обеспечения сложной логистики и несет дополнительные риски обеспечения качества и безопасности применения, связанные с донорским материалом. Возможность снижения стоимости производства данных препаратов связана с оптимизацией логистики доставки донорского материала и готового препарата и автоматизации процесса производства. Существенного снижения стоимости препаратов можно ожидать от замены используемых в настоящее время вирусных векторов на невирусные

системы доставки геннотерапевтических конструкций. Такой подход поможет сократить время и затраты на каждую единицу лекарственного препарата. Создание научно-технологических комплексов для разработки персонализированных лекарственных препаратов на основе ГСК ГТ поможет автоматизировать, ускорить и масштабировать процесс производства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработка ГСК ГТ *ex vivo* актуальна и перспективна на сегодняшний день. Развитие такой терапии предоставит возможности для этиологического лечения многих неизлечимых генетических заболеваний. Дальнейшее изучение данного направления генной терапии, совершенствование имеющихся методов и разработка новых позволят расширить количество заболеваний, лечение которых эффективно с клинической и экономической точек зрения препаратами ГСК ГТ.

Литература

1. Carvalho M, Sepodes B, Martins AP. Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-Art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2017; 4. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2017.00182/full>.
2. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part ii. gene therapy strategies and applications. 2014. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4440458/>.
3. CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer [Internet]. Cancer gov. 2022. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>.
4. Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024; 9 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38565561/>.
5. Kohn DB, Booth C, Shaw KL, Xu-Bayford J, Garabedian E, Trevisan V, et al. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2021; 384 (21): 2002–13. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2027675>.
6. Zhu Y, Zhu L, Wang X, Jin H. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell Death and Disease* [Internet]. 2022 Jul 23;13(7). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-05075-2>
7. Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023; 8 (1). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01309-7>.
8. Ferrari S, Valeri E, Conti A, Scala S, Aprile A, Di Micco R, et al. Genetic engineering meets hematopoietic stem cell biology for next-generation gene therapy. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (5): 549–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37146580/>.
9. Meaker GA, Wilkinson AC. Ex vivo hematopoietic stem cell expansion technologies: recent progress, applications, and open questions. *Experimental Hematology*. 2023; 130: 104136. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11511678/>.
10. Horgan C, Watts K, Ram D, Rust S, Hutton R, Jones S, et al. A retrospective cohort study of Libmeldy (atidarsagene autotemcel) for MLD: What we have accomplished and what opportunities lie ahead. *JIMD Reports*. 2023; 64 (5): 346–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmd2.12378>.
11. Duncan CN, Bledsoe JR, Grzywacz B, Beckman A, Bonner M, Eichler FS, et al. Hematologic Cancer after Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. *New England Journal of Medicine*. 2024; 391 (14): 1287–301. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2405541>.
12. Rabinowitz J, Chan YK, Samulski RJ. Adeno-Associated Virus (AAV) Versus Immune Response. *Viruses*. 2019; 11 (2): 102. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/102>.
13. de Vasconcelos P, Lacerda JF. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Neurological Disorders: A Focus on Inborn Errors of Metabolism. *Front Cell Neurosci*. 2022; 16: 895511. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2022.895511/full>.
14. Mikulska M, Gualandi F, Anserini P. Early and late complications of hematopoietic stem cell transplantation. *Handb Clin Neurol*. 2024; 202: 135–51.
15. Maragkou I, Maragkou I. The most expensive drugs in the US. *Pharmaceutical Technology*. 2024. Available from: <https://www.pharmaceutical-technology.com/features/the-most-expensive-drugs-in-the-us/>.

References

1. Carvalho M, Sepodes B, Martins AP. Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-Art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework. *Frontiers in Medicine* [Internet]. 2017; 4. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/medicine/articles/10.3389/fmed.2017.00182/full>.
2. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: part ii. gene therapy strategies and applications. 2014. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4440458/>.
3. CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer [Internet]. Cancer gov. 2022. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>.
4. Wang JH, Gessler DJ, Zhan W, Gallagher TL, Gao G. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024; 9 (1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38565561/>.
5. Kohn DB, Booth C, Shaw KL, Xu-Bayford J, Garabedian E, Trevisan V, et al. Autologous Ex Vivo Lentiviral Gene Therapy for Adenosine Deaminase Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2021; 384 (21): 2002–13. Available from: <https://www>.

- nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2027675.
6. Zhu Y, Zhu L, Wang X, Jin H. RNA-based therapeutics: an overview and prospectus. *Cell Death and Disease* [Internet]. 2022 Jul 23;13(7). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41419-022-05075-2>
 7. Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023; 8 (1). Available from: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01309-7>.
 8. Ferrari S, Valeri E, Conti A, Scala S, Aprile A, Di Micco R, et al. Genetic engineering meets hematopoietic stem cell biology for next-generation gene therapy. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (5): 549–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37146580/>.
 9. Meaker GA, Wilkinson AC. Ex vivo hematopoietic stem cell expansion technologies: recent progress, applications, and open questions. *Experimental Hematology*. 2023; 130: 104136. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11511678/>.
 10. Horgan C, Watts K, Ram D, Rust S, Hutton R, Jones S, et al. A retrospective cohort study of Libmeldy (atidarsagene autotemcel) for MLD: What we have accomplished and what opportunities lie ahead. *JIMD Reports*. 2023; 64 (5): 346–52. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jmd2.12378>.
 11. Duncan CN, Bledsoe JR, Grzywacz B, Beckman A, Bonner M, Eichler FS, et al. Hematologic Cancer after Gene Therapy for Cerebral Adrenoleukodystrophy. *New England Journal of Medicine*. 2024; 391 (14): 1287–301. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2405541>.
 12. Rabinowitz J, Chan YK, Samulski RJ. Adeno-Associated Virus (AAV) Versus Immune Response. *Viruses*. 2019; 11 (2): 102. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/102>.
 13. de Vasconcelos P, Lacerda JF. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Neurological Disorders: A Focus on Inborn Errors of Metabolism. *Front Cell Neurosci*. 2022; 16: 895511. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-neuroscience/articles/10.3389/fncel.2022.895511/full>.
 14. Mikulska M, Gualandi F, Anserini P. Early and late complications of hematopoietic stem cell transplantation. *Handb Clin Neurol*. 2024; 202: 135–51.
 15. Maragkou I, Maragkou I. The most expensive drugs in the US. *Pharmaceutical Technology*. 2024. Available from: <https://www.pharmaceutical-technology.com/features/the-most-expensive-drugs-in-the-us/>.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ В ПРЕОПЕРАЦИОННОМ ТЕСТЕ ИНГИБИТОРАМИ АРОМАТАЗЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О. В. Бурменская [✉], Д. Ю. Трофимов, В. В. Кометова, М. В. Родионова, В. В. Родионов

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

Тестовая предоперационная гормонотерапия стала стандартной процедурой лечения ESR+/Her2-негативного рака молочной железы ранних стадий. Хорошим подспорьем в оценке эффективности данной терапии могут стать транскрипционные профили генов. Целью исследования было оценить изменения экспрессионной активности генов при проведении предоперационного теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы у женщин постменопаузального возраста при ESR+/HER2-негативном раке молочной железы. В исследование вошло 100 больных раком молочной железы, проходивших лечение в отделении патологии молочной железы ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». Выполнено патоморфологическое исследование FFPE-блоков трепан-биопсии, проведенной до назначения теста на гормоночувствительность, и операционного материала, а также иммуногистохимическое (Ki67, ER, PR, HER2/neu) и молекулярно-генетическое исследование экспрессионной панели 45 целевых генов методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Применение ингибиторов ароматазы в предоперационном тесте на гормоночувствительность сопровождается статистически значимыми изменениями в экспрессии мРНК 37 генов в опухолях молочной железы, из них снижение уровня экспрессии установлено для 35 генов (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *CD274/PD-L1*), повышение для 2 генов (*SFRP1*, *KRT5*). Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем при разработке теста на гормоночувствительность и персонализации адъювантной системной терапии больных раком молочной железы.

Ключевые слова: ESR+/HER2-негативный рак молочной железы, экспрессия мРНК генов, ингибиторы ароматазы, летрозол, обратная транскрипция, количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, ОТ-кПЦР

Финансирование: работа выполнена при частичной финансовой поддержке научных исследований в рамках Государственного задания «Персонализации адъювантной терапии больных с люминальными Her2-негативными подтипами рака молочной железы с использованием предоперационного теста на гормоночувствительность» (номер государственного учета в системе ЕГИСУ НИОКТР – 124020600031-3).

Вклад авторов: В. В. Родионов — концепция и дизайн исследования; М. В. Родионова, В. В. Кометова — сбор и обработка материала; Д. Ю. Трофимов, О. В. Бурменская — организация и проведение ПЦР-исследования; О. В. Бурменская — анализ результатов, статистическая обработка данных, подготовка рукописи; В. В. Родионов, Д. Ю. Трофимов — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава РФ (протокол № 03 от 21 марта 2024 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Владимировна Бурменская
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; bourmenska@mail.ru

Статья получена: 08.11.2024 **Статья принята к печати:** 05.12.2024 **Опубликована онлайн:** 21.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.059

TRANSCRIPTION PROFILE IN PREOPERATIVE AROMATASE INHIBITOR RESPONSE TEST IN BREAST CANCER PATIENTS

Burmenskaya OV [✉], Trofimov DYu, Kometova VV, Rodionova MV, Rodionov VV

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

Today, preoperative hormone therapy is a standard procedure in the context of treatment of ESR+/HER2-negative early-stage breast cancer. Transcription profiles of genes helps make assessment of effectiveness of this therapy more accurate. This study aimed to investigate the changes in gene expression caused by the preoperative aromatase inhibitor response test in postmenopausal women with ESR+/HER2-negative breast cancer. The participants were 100 breast cancer patients treated at the Department of Breast Pathology of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. We did a pathomorphological study of FFPE blocks (trephine biopsied before the hormone response test was prescribed) and intraoperative samples, and immunohistochemical (Ki67, ER, PR, HER2/neu) and molecular genetic studies of 45 target genes (quantitative RT-PCR). Aromatase inhibitors in the preoperative hormone response test caused significant changes in the mRNA expression of 37 genes in breast tumors: for 35 of them (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *CD274/PD-L1*) the level was decreased, and for 2 genes it increased (*SFRP1*, *KRT5*). The results of this study can be used in the development of a hormone sensitivity test and personification of adjuvant systemic treatment for breast cancer patients.

Keywords: ESR+/Her2-negative breast cancer, mRNA gene expression, aromatase inhibitors, letrozole, real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR

Funding: the study was partially supported under the State Task "Personification of adjuvant treatment of patients with luminal HER2-negative subtypes of breast cancer enabled by a preoperative hormone sensitivity test" (state registry number in the Unified State R&D Efforts Registration System (EGISU NIOKTR): 124020600031-3).

Author contribution: VV Rodionov — study conceptualization and design; MV Rodionova, VV Kometova — material collection and processing; DYu Trofimov, OV Burmenskaya — PCR testing; OV Burmenskaya — analysis of the results, statistical processing of the data, manuscript authoring; VV Rodionov, DYu Trofimov — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Committee on Biomedical Ethics of V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Minutes #03 of March 21, 2024). All patients signed an informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga Vladimirovna Burmenskaya
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; bourmenska@mail.ru

Received: 08.11.2024 **Accepted:** 05.12.2024 **Published online:** 21.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.059

Выделение пяти основных молекулярных подтипов опухолей молочной железы и дифференциальный подход к терапии больных раком молочной железы (PMЖ) стали настоящим прорывом в онкологии. Опухоли, экспрессирующие эстрогеновый (ESR) и прогестероновый (PGR) рецепторы, относятся к люминальным подтипам и, как правило, хорошо поддаются гормональной терапии.

У женщин в постменопаузе эстрогены образуются преимущественно при участии фермента ароматазы, который превращает синтезирующиеся в надпочечниках и жировой ткани андрогены (тестостерон и андростендион) в эстрадиол и эстрон. Поэтому для данной когорты пациенток при лечении опухолей молочной железы люминальных подтипов используют селективные ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол). Ингибиторы ароматазы блокируют синтез эстрогенов путем высокоспецифичного конкурентного связывания с субъединицей ароматазы, кодируемой геном цитохрома P450 CYP19A1.

Экспрессирующие эстрогеновый рецептор опухоли доминируют в структуре молекулярных подтипов PMЖ [1, 2]. Однако даже внутри этой большой группы имеются существенные различия в особенностях течения заболевания и терапевтического ответа на гормонотерапию, что диктует необходимость изучения всех доступных биологических характеристик злокачественного новообразования для формирования оптимальной тактики лечения.

Одним из таких инструментов является предоперационный тест на гормоночувствительность. Смысл теста заключается в краткосрочном (2–4 недели) назначении гормональных препаратов на дооперационном этапе. Оценка динамики пролиферативной активности опухоли по изменению уровня Ki67 и экспрессии гормональных рецепторов позволяет спрогнозировать клинический ответ и оценить эффективность эндокринотерапии *in vivo*, и соответственно избавить часть пациентов от ненужной высокотоксичной химиотерапии. Рекомендация по проведению тестовой гормонотерапии включена в Консенсус ведущей Международной конференции по раннему раку молочной железы в Санкт-Галлене уже в 2021 г. и сохранилась в рекомендациях 2023 г. [3, 4], а также в отечественных рекомендациях по лечению рака молочной железы [5, 6].

Полезным инструментом в оценке эффективности проводимой терапии могут стать транскрипционные панели генов, задействованные в онкогенезе, разработанные специально для PMЖ, такие как Oncotype DX, PAM50, Mammaprint, и отечественные исследования [7, 8].

В связи с этим цель исследования состояла в оценке изменения экспрессионной активности генов при проведении предоперационного теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы у женщин постменопаузального возраста при ESR+/HER2-негативном раке молочной железы.

Цель исследования состояла в оценке изменения экспрессионной активности генов при проведении предоперационного теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы у женщин постменопаузального возраста при ESR+/HER2-негативном раке молочной железы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 100 больных PMЖ, получивших лечение в отделении патологии молочной железы ФГБУ «НМИЦ АГП имени В. И. Кулакова в период с января 2019 г.

по август 2024 г. Для каждой пациентки исследован материал трепан-биопсии до проведения теста на гормоночувствительность и материал опухоли, полученный в результате хирургического вмешательства.

Критерии включения: инвазивный PMЖ, люминальный Her2-негативный подтип опухоли, постменопаузальный возраст, предоперационный тест на чувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы. Критерии исключения: неадекватное качество полученного материала трепан-биопсии для проведения молекулярно-генетических исследований.

В качестве теста на гормоночувствительность на дооперационном этапе пациенты в течение 2–4 недель принимали ингибиторы ароматазы — летрозол 2,5 мг или анастрозол 1 мг один раз в сутки.

Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного и операционного материала. Образцы отбирали в течение 30 мин после удаления опухоли и фиксировали в течение 48 ч в нейтральном забуференном формалине. После фиксации образцы помещали в автоматический микроволновой гистопроцессор LOGOS (Milestone, Италия) для ускоренной проводки тканей. Полученные срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопические препараты исследовали методом обзорной микроскопии, которую осуществляли на световом микроскопе Olympus BX46 (Olympus Corp., Япония). Иммуногистохимическую диагностику проводили на иммуногистостейнере BenchMark ULTRA (Ventana, Roche) с использованием антител к рецепторам эстрогенов (ER, клон SP1, VENTANA), прогестерона (PgR, клон 1E2, VENTANA), к Ki-67 (клон MIB-1, VENTANA), к онкопротеину гена эпидермального фактора роста 2 типа человека (c-erbB2).

При проведении молекулярно-генетических исследований использовали транскрипционную панель, включающую 45 целевых (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *GRB7*, *EGFR*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *MYC*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *SFRP1*, *TMEM45B*, *TMEM45A*, *TPX2*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *ANLN*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *TPT1*, *SCGB2A2*, *KRT5*, *MIA*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *NAT1*, *CD68*, *TRAC*, *CD274/PD-L1*) и три референсных (*B2M*, *GUSB*, *HPRT1*) гена. Для проведения исследования парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм в количестве 2–3 штук помещали в сухие пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Подбор и подготовка материала осуществлялись врачом-патоморфологом с учетом результатов патоморфологического исследования.

Выделение тотальной РНК проводили после предварительной обработки образцов протеиназой К (набор реагентов «Проба-ПК»; «ДНК-Технология ТС», Россия), далее использовали набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот на основе спиртового осаждения «Проба НК-плюс» («ДНК-Технология ТС», Россия). Полученные препараты РНК сразу использовали для постановки реакции обратной транскрипции со смесью олигонуклеотидов, специфичных для каждого гена. Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 30 мин при температуре 40 °С с последующей инактивацией обратной транскриптазы в течение 10 мин при температуре 95 °С.

Транскрипционный профиль генов определяли методом мультиплексной ОТ-ПЦР «в реальном времени». Постановку ПЦР осуществляли с использованием детектирующих амплификаторов «ДТпрайм» («ДНК-Технология ТС», Россия) по программе 94 °С 5 мин; пять циклов 94 °С

Таблица 1. Патоморфологическая характеристика опухолей

Характеристика	Количество (%)
Размер опухолевого очага (pT)	
T1 (до 2 см): • T1a (> 0,1 см, но ≤0,5 см) • T1b (> 0,5 см, но ≤1 см) • T1c (> 1 см, но ≤ 2 см)	75 (75%)
	2 (2%)
	21 (21%)
	52 (52%)
T2 (> 2, но ≤ 5)	25 (25%)
Статус региональных лимфоузлов (pN)	
N0	76 (76%)
N1	17 (17%)
N2	4 (4%)
N3	3 (3%)
Гистологический вариант	
Инвазивный рак неспецифического типа	65 (65%)
Дольковый рак	23 (23%)
Особые варианты рака	12 (12%)
Степень злокачественности	
G1	18 (18%)
G2	74 (74%)
G3	8 (8%)

30 с — 64 °C 15 с; далее 45 циклов 94 °C 10 с — 64 °C 15 с и хранение.

В состав реакционных смесей входили олигонуклеотиды, специфичные в отношении мРНК, не амплифицирующие с матриц геномной ДНК, фланкирующие ампликоны размером до 100–120 п.н., что важно при работе с ДНК после фиксации в формалине. Детекцию продуктов амплификации осуществляли при температуре отжига праймеров за счет использования флуоресцентно-меченных TaqMan проб (Fam, Cy5).

По завершении амплификации уровень представленности транскриптов рассчитывали методом сравнения индикаторных циклов (метод ΔCt) с нормировкой относительно референсных генов *B2M*, *GUSB*, *HPRT1*. Данные представлены в относительных единицах (о.е.) в ln-шкале.

Для лучшего восприятия результатов исследования было рассчитано соотношение уровня экспрессии до терапии к уровню экспрессии после терапии (R) по формуле: $R = Eb/Ea$, где Eb — нормированный уровень экспрессии до терапии, Ea — нормированный уровень экспрессии после терапии. $R > 1$ расценивали как снижение экспрессии, $R < 1$ — как повышение экспрессии.

Статистические методы

Полученные результаты представлены в виде Me [1Q–3Q] (медиана, 1-й и 3-й квартили). При сравнении транскрипционных профилей генов до и после терапии ингибиторами ароматазы использовали T-критерий Уилкоксона для сравнения двух зависимых выборок. Критерий статистической значимости результатов принимали во внимание при значении $p < 0,01$. Расчет проводили с помощью программы статистической обработки результатов SPSS 17 (IBM, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 100 пациенток РМЖ в возрасте 49–84 лет (63,3 [51–79]). Патоморфологическая характеристика опухолей представлена в табл. 1.

Размеры опухоли менее 2 см были зарегистрированы в 75% случаев. У 2/3 (76%) пациенток метастазы в региональные лимфатические узлы не были диагностированы. Во всех случаях заболевания отсутствовали отдаленные метастазы.

Среди гистологических вариантов преобладал неспецифический вариант — 65 (65%). В исследование включено 18% образцов с низкой степенью злокачественности (G1), 74% — с умеренной (G2) и 8% — с высокой степенью (G3).

При определении подтипа РМЖ методом ИГХ в 44 (44%) случаях был диагностирован люминальный А подтип и в 56 случаях (56%) — люминальный В Her2-негативный подтип опухоли.

После применения ингибиторов ароматазы в качестве предоперационного теста на гормоночувствительность в исследуемых образцах опухолей определены статистически значимые изменения в экспрессии мРНК 37 генов, из них снижение уровня экспрессии установлено для 35 генов (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *CD274/PD-L1*), повышение для двух генов *SFRP1* и *KRT5* (табл. 2).

На рисунке представлены результаты по пяти маркерам пролиферации, рецепторам эстрогена и прогестерона, уровень которых снизился после терапии.

Статистически значимое снижение экспрессии выявлено в группе маркеров пролиферации и регуляции клеточного

Таблица 2. Изменения в экспрессии мРНК маркеров после применения ингибиторов ароматазы

Маркер	Медиана уровня экспрессии, ln			Изменение уровня экспрессии, во сколько раз			
	до терапии	после терапии	ρ -уровень	Медиана	1-й квартиль	3-й квартиль	Доля образцов с изменением экспрессии*
Маркеры пролиферации и регуляции клеточного цикла (снижение экспрессии*)							
MKI67	-4	-5,4	7,27E-16	3,7	1,9	8,3	91%
MYBL2	-3,1	-4,9	5,17E-18	5,5	3	10,7	97%
AURKA	-4,7	-6,1	3,67E-17	3,9	2,4	6,1	96%
CCNB1	-3,3	-4,2	3,15E-14	2,1	1,5	3,9	90%
BIRC5	-5	-7	9,99E-16	8,8	3,5	16,6	90%
CCND1	-0,4	-1,3	3,11E-16	2,4	1,8	3,3	92%
CCNE1	-5	-6	2,92E-15	3	2	4	91%
CDKN2A	-2,4	-2,6	5,14E-06	1,2	0,9	1,7	70%
KIF14	-6,5	-8,1	1,19E-13	3,7	2,1	7,2	85%
PPP2R2A	-2,9	-3,4	2,56E-09	1,7	1,1	2,7	77%
PTTG1	-3,4	-4,6	8,12E-18	3,5	2,1	5,1	97%
TMEM45B	-2,9	-3,3	4,50E-05	1,4	0,9	2,4	67%
TMEM45A	-4,2	-4,2	0,036	-	-	-	-
TPX2	-3,2	-4,6	7,09E-17	4,8	2,7	8	96%
TPT1	-6	-6,2	0,269	-	-	-	-
ANLN	-4,1	-5,7	6,03E-17	4,5	3	7,5	97%
Миграция, инвазия, организация цитоскелета (снижение экспрессии)							
EMSY	-2,8	-3,4	1,99E-14	1,6	1,3	2,1	88%
PAK1	-2,4	-3	1,20E-16	1,8	1,5	2,4	93%
MMP11	-1,6	-3,1	8,58E-15	3,4	1,9	6,3	94%
CTSL2	-4,4	-5	2,32E-08	1,7	1,1	2,5	77%
Репликация и репарация ДНК (снижение экспрессии)							
EXO1	-5,4	-7,4	1,20E-17	6,4	3,1	15,3	
TYMS	-4,1	-5,2	5,18E-17	3	1,9	5	
Рецепторы гормонов (снижение экспрессии)							
ESR1	0,1	-0,7	6,11E-12	2,3	1,2	3,6	
PGR	-2,8	-4,7	1,90E-16	5,5	2,6	11,1	
AR	-1,9	-3	3,30E-16	3,4	2	5,7	
Супрессоры опухолей							
PTEN (снижение)	-2,1	-2,5	1,95E-09	1,4	1	2,1	
SFRP1 (повышение*)	-4	-3,5	0,007	1,4	0,6	4,1	
Апоптоз (снижение экспрессии)							
BCL2	-2,9	-3,5	5,09E-11	2	1,1	2,9	
BAG1	-2,9	-3,3	3,86E-15	1,6	1,2	2,2	
Рецепторы ростовых факторов (снижение экспрессии)							
GRB7	-2,2	-2,2	0,064	-	-	-	
FGFR4	-4,9	-5,5	2,18E-06	1,7	1	3,3	
ERBB2	-0,8	-1,2	2,55E-09	1,4	1	2,1	
EGFR	-3,7	-3,7	0,331	-	-	-	
Дифференцировка клеток							
KRT5 (повышение)	-5	-4,3	0,001	1,3	0,8	3,7	
SCGB2A2 (снижение)	-0,2	-1,2	0,002	2,2	0,5	6,1	
MIA	-6,1	-6,3	0,412	-	-	-	
Факторы транскрипции (снижение экспрессии)							
FOXA1	-0,7	-1,4	1,71E-13	1,9	1,5	2,7	
GATA3	-1,1	-1,9	1,65E-12	2,3	1,4	3,4	
ZNF703	-3,6	-5,3	8,43E-18	6,6	2,9	12,6	
MYC	-1,3	-1,2	0,029	-	-	-	
ДРУГОЕ (снижение)							
NAT1	-3,6	-4,7	1,93E-15	2,9	1,6	4,9	
UBE2T	-3,4	-4,9	1,03E-17	3,9	2,3	5,9	
Иммунитет							
CD274 (снижение)	-5,7	-5,9	0,003	1,3	0,8	1,9	
TRAC	-2,4	-2,3	0,386	-	-	-	
CD68	-2	-2	0,4	-	-	-	

Примечание: $R > 1$ — снижение экспрессии, $R < 1$ — повышение экспрессии.

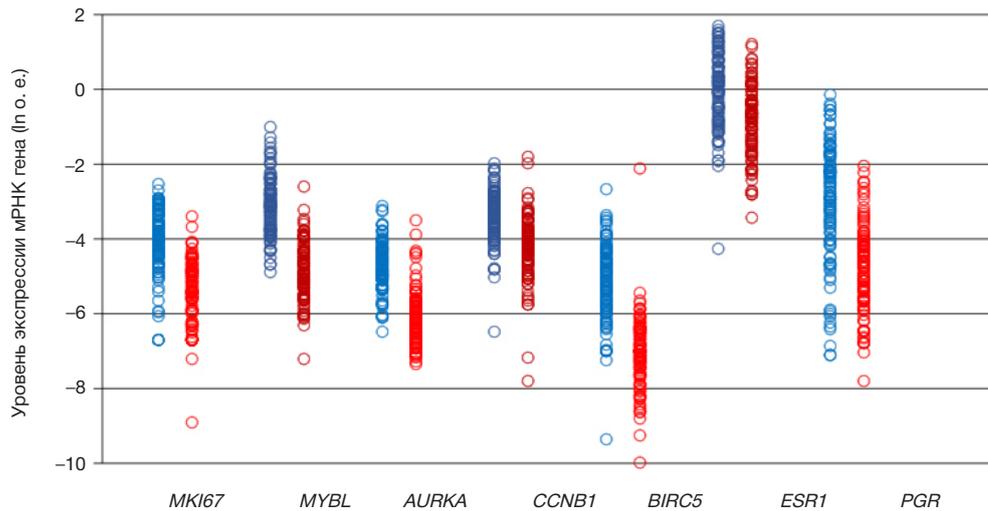


Рис. Изменение экспрессии мРНК генов пролиферации и гормональной рецепции при проведении теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы. Точками отмечены индивидуальные показатели уровня экспрессии мРНК гена в опухоли

цикла. Наиболее выраженные изменения отмечены для генов *MYBL2*, *AURKA*, *PTTG1*, *TPX2*, *ANLN*, для которых снижение экспрессии наблюдали у 96–97% женщин в среднем от 3,5 до 5,5 раз.

Статистически значимое снижение экспрессии наблюдали также:

- в группе маркеров миграции клеток и организации цитоскелета, наиболее выраженное снижение наблюдали для *MMP11* у 94% женщин в среднем 3,4 раза (интерквартильный размах 1,9–6,3);
- в группе маркеров репарации ДНК, наиболее выраженное снижение выявлено для *EXO1* у 96% женщин в среднем 6,4 раза (интерквартильный размах 3,1–15,3);
- в группе факторов транскрипции, наиболее выраженное снижение выявлено для *ZNF703* у 97% женщин в среднем 6,6 раза (интерквартильный размах 2,9–12,6);
- в группе гормональных рецепторов отмечено снижение уровня экспрессии мРНК гена *ESR1* у 84% женщин в среднем в 2,3 раза, однако наиболее выраженное снижение выявлено для генов *PGR* и *AR* более чем в 2 раза и более чем у 90% женщин;
- для несгруппированных маркеров гена убиквитинирования белков *UBE2T* и гена ариламин-N-ацетилтрансферазы *NAT1* более чем у 90% женщин.

Чуть менее впечатляющее, но статистически значимое снижение экспрессии наблюдали для маркеров апоптоза (*BCL2*, *BAG*), рецепторов ростовых факторов (*FGFR4*, *ERBB2*), секреторного белка маммоглобин *SCGB2A2* и *PTEN*.

Статистически значимое повышение экспрессии отмечено для маркера дифференцировки эпителиальных клеток цитокератина *KRT5* и супрессора опухолей *SFRP1*: более чем у половины пациенток, в 67% и в 57% случаев соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эстрогенпозитивные или люминальные опухоли молочной железы составляют до 70–75% всех случаев РМЖ [1, 2], а ESR1-зависимые сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, играют одну из ключевых ролей в опухолевой прогрессии.

Основу современных представлений о механизме действия стероидных гормонов заложила теория E. V. Jensen, предложившего модель действия гормона. В рамках этой модели молекула стероидного гормона, проникая внутрь клетки-мишени, связывается со специфическим рецептором,

затем образовавшийся гормон-рецепторный комплекс транслоцируется в клеточное ядро, где взаимодействует со специфическими последовательностями ДНК и изменяет экспрессию соответствующих генов [9].

Рецептор ESR1 является фактором транскрипции, активируемым эстрогенами. Как фактор транскрипции, ESR1 регулирует экспрессию генов, участвующих в клеточных циклах, пролиферации и апоптозе. Активация ESR1 запускает экспрессию таких факторов, как MYC, Cyclin D1, FOXM1, GREB1, BCL2 или амфирегулин, IGF-1 и CXCL12, которые обладают онкогенным потенциалом, увеличивая пролиферацию раковых клеток [2]. Полагают, что лиганд-активированный ESR1 связывается с эстроген-чувствительными элементами (ERE, estrogen responsive element) в промоторах целевых генов, также ESR1 может взаимодействовать с факторами транскрипции, такими как активаторный белок 1 (AP1) и специфический белок 1 (SP1). Таким образом, это геномное действие регулирует транскрипцию сотен целевых генов, участвующих в росте и дифференцировке клеток [2, 10].

ESR1 также может быть встроен в цитоплазматическую мембрану клеток в специальном углублении (кавеоле) и взаимодействовать с G-белками, участвуя таким образом в продукции вторичных мессенджеров (цАМФ) и стимуляции различных сигнальных путей, например, PI3K/AKT или Ras/MAPK. Эта негеномная активность ERα в итоге приводит к активации факторов транскрипции, участвующих в регуляции пролиферации и выживания клеток [2, 10].

Поэтому не вызывает сомнения, что отсутствие или снижение количества лиганда ESR1 (эстрогенов) при терапии ингибиторами ароматазы приводит к такому впечатляющему снижению экспрессии мРНК большого числа генов. Согласно полученным результатам, статистически значимое снижение экспрессии мРНК отмечено для факторов транскрипции *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, апоптоза *BCL2*, *BAG1*, пролиферации и регуляции клеточного цикла (*MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *ANLN*, *TPX2*). В условиях снижения пролиферативной активности также снижается экспрессия маркеров репликации и контроля репарации ДНК (*TYMS*, *EXO1*), маркеров организации цитоскелета и миграции клеток (*MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK*) и убиквитинирования белков *UBE2T*.

Интересно, что в другом исследовании при атипичной гиперплазии молочной железы наблюдалось повышение экспрессии мРНК генов, включенных в нашу панель, таких как *ESR1*, *AR*, рецептора эпидермального фактора роста *ERBB2*, транскрипционных факторов *FOXA1*, *GATA3*, *ZNF703*, а также снижение цитокератина *KRT5* и супрессора опухолей *SFRP1* [11]. Данные изменения авторы связали с активацией сигнальных путей, задействованных в онкогенезе.

В нашем исследовании после терапии ингибиторами ароматазы получены данные о снижении экспрессии мРНК генов *ESR1*, *AR*, *FOXA1*, *GATA3*, *ZNF703*, *ERBB2* и о повышении экспрессии мРНК генов *KRT5* и *SFRP1*, что может быть свидетельством позитивного влияния проводимой терапии на сигнальные пути, задействованные в онкогенезе.

Только для двух маркеров *KRT5* и *SFRP1* в нашем исследовании отмечено статистически значимое повышение экспрессии. Высокая экспрессия гена цитокератина *KRT5* характерна для базального эпителия молочной железы. Люминальный эпителий экспрессирует цитокератины *KRT8* и *KRT18* [2].

В настоящее время общепринято представление о том, что главным физиологическим регулятором экспрессии ядерных рецепторов в организме является концентрация циркулирующих стероидных гормонов. Эстрогены усиливают синтез собственных рецепторов, а также рецепторов прогестерона и рецепторов андрогенов [10]. Поэтому снижение экспрессии мРНК гена *ESR1*,

а также *PGR* и *AR* на фоне проводимой терапии было прогнозируемым. Нужно отметить, что при проведении исследования в первую очередь мы обратили внимание на снижение экспрессии прогестеронового рецептора, даже в большей степени, чем *ESR1*.

Экспрессию мРНК гена *PGR* напрямую регулирует активированный эстрогеновый рецептор. Некоторые авторы даже рассматривают *PGR* как индикатор функциональности *ESR1* [12]. Поэтому на фоне снижения эстрогенов и транскрипционной активности гена *ESR1* экспрессия мРНК гена *PGR* также снижается.

Выводы

Применение ингибиторов ароматазы в предоперационном тесте на гормоночувствительность сопровождается статистически значимыми изменениями в экспрессии мРНК 37 генов, из них снижение уровня экспрессии мРНК установлено для 35 генов (*MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *TYMS*, *EXO1*, *PTEN*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *CD274*), повышение для 2 генов (*KRT5* и *SFRP1*). Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшей разработке способов оценки эффективности теста на гормоночувствительность и персонализации адъювантной системной терапии больных раком молочной железы.

Литература

1. Ahn SG, Nam SJ, Ahn SH, Jung Y, Park HK, Lee SJ, et al. Clinical Outcomes Following Letrozole Treatment according to Estrogen Receptor Expression in Postmenopausal Women: LETTER Study (KBCSG-006). *J Breast Cancer*. 2021; 24 (2): 164–74. DOI: 10.4048/jbc.2021.24.e17.
2. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6834. DOI: 10.3390/ijms24076834.
3. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, et al. Clinical and genomic risk to guide the use of adjuvant therapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 2019; 380 (25): 2395–405. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904819>.
4. Burstein HJ, Curigiano G, Thürlimann B, et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol*. 2021; 32 (10): 1216–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.023>.
5. Золотой стандарт профилактики, диагностики, лечения и реабилитации больных РМЖ. Российское общество онкомаммологов. 2024; 297 с.
6. Тюляндин С. А., Стенина М. Б., Фролова М. А. Практические инструменты, облегчающие выбор адъювантной лекарственной терапии у больных операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы. Злокачественные опухоли. 2024; 14 (2): 51–57. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2024-003>.
7. Боженко В. К., Троценко И. Д., Кудинова Е. А., Варданян С. Г.,

- Захаренко М. В., Солодкий В. А., Макарова М. В. Возможности типирования рака молочной железы с использованием методики ОТ-ПЦР. *Сибирский онкологический журнал*. 2019; 18 (5): 61–67. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-61-67.
8. Бурменская О. В., Трофимов Д. Ю., Кометова В. В., Сергеев И. В., Маерле А. В., Родионов В. В., и др. Разработка и опыт использования транскрипционной сигнатуры генов в диагностике молекулярных подтипов рака молочной железы. *Акушерство и гинекология*. 2020; 2: 132–140. Доступно по ссылке: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.2.132-140>.
9. Красильников М. А., Щербаков А. М. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска. *Успехи молекулярной онкологии*. 2014; 1: 18–26.
10. Довжикова И. В., Андриевская И. А. Рецепторы эстрогенов (обзор литературы). Часть 1. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2019; 72: 120–27. DOI: 10.12737/article_5d0ad2e5d54867.15780111.
11. Gregory KJ, Roberts AL, Conlon EM, Mayfield JA, Hagen MJ, Crisi GM, et al. Gene expression signature of atypical breast hyperplasia and regulation by SFRP1. *Breast Cancer Res*. 2019; 21 (1): 76. DOI: 10.1186/s13058-019-1157-5.
12. Kumar M, Salem K, Jeffery JJ, Yan Y, Mahajan AM, Fowler AM. Longitudinal Molecular Imaging of Progesterone Receptor Reveals Early Differential Response to Endocrine Therapy in Breast Cancer with an Activating ESR1 Mutation. *J Nucl Med*. 2021; 62 (4): 500–506. DOI: 10.2967/jnumed.120.249508. Epub 2020 Aug 28.

References

1. Ahn SG, Nam SJ, Ahn SH, Jung Y, Park HK, Lee SJ, et al. Clinical Outcomes Following Letrozole Treatment according to Estrogen Receptor Expression in Postmenopausal Women: LETTER Study (KBCSG-006). *J Breast Cancer*. 2021; 24 (2): 164–74. DOI:

- 10.4048/jbc.2021.24.e17.
2. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6834. DOI: 10.3390/ijms24076834.

3. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, et al. Clinical and genomic risk to guide the use of adjuvant therapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2019; 380 (25): 2395–405. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904819>.
4. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol.* 2021; 32 (10): 1216–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.023>.
5. Zolotoj standart profilaktiki, diagnostiki, lechenija i rehabilitacii bol'nyh RMZh. *Rossijskoe obshhestvo onkomammologov.* 2024; 297 s. Russian.
6. Tjuljandin SA, Stenina MB, Frolova MA. Prakticheskie instrumenty, oblegchajushhie vybor ad#juvantnoj lekarstvennoj terapii u bol'nyh operabel'nym l#jurnal'nym HER2-negativnym rakom molochnoj zhelezy. *Zlokachestvennye opuholi.* 2024; 14 (2): 51–57. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2024-003>. Russian.
7. Bozhenko VK, Trocenko ID, Kudinova EA, Vardanjan SG, Zaharenko MV, Solodkij VA, Makarova MV. Vozmozhnosti tipirovanija raka molochnoj zhelezy s ispol'zovaniem metodiki OT-PCR. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2019; 18 (5): 61–67. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-61-67. Russian.
8. Burmenskaya OV, Trofimov DYu, Kometova VV, Sergeev IV, Maerle AV, Rodionov VV, i dr. Razrabotka i opyt ispol'zovanija transkripcionnoj signatury genov v diagnostike molekuljarnyh podtipov raka molochnoj zhelezy. *Akusherstvo i ginekologija.* 2020; 2: 132–140. Dostupno po ssylke: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.2.132-140>. Russian.
9. Krasilnikov MA, Shherbakov AM. Signal'nye puti, reguliruemye jestrogenami, i ih rol' v opuholevoj progressii: novye fakty i napravlenija poiska. *Uspehi molekuljarnoj onkologii.* 2014; 1: 18–26. Russian.
10. Dovzhikova IV, Andrievskaja IA. Receptory jestrogenov (obzor literatury). *Chast' 1. Bjul'eten' fiziologii i patologii dyhanija.* 2019; 72: 120–27. DOI: 10.12737/article_5d0ad2e5d54867.15780111. Russian.
11. Gregory KJ, Roberts AL, Conlon EM, Mayfield JA, Hagen MJ, Crisi GM, et al. Gene expression signature of atypical breast hyperplasia and regulation by SFRP1. *Breast Cancer Res.* 2019; 21 (1): 76. DOI: 10.1186/s13058-019-1157-5.
12. Kumar M, Salem K, Jeffery JJ, Yan Y, Mahajan AM, Fowler AM. Longitudinal Molecular Imaging of Progesterone Receptor Reveals Early Differential Response to Endocrine Therapy in Breast Cancer with an Activating ESR1 Mutation. *J Nucl Med.* 2021; 62 (4): 500–506. DOI: 10.2967/jnumed.120.249508. Epub 2020 Aug 28.

РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОДЕСТРУКТИВНОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

М. В. Осиков^{1,2}✉, Е. А. Коробкин^{1,2}

¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения России, Челябинск, Россия

² Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

У пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) несколько чаще наблюдаются снижение минеральной плотности кости (МПК), остеопения и остеопороз. Риск остеопоротических переломов при ХЛЛ выше, чем у здоровых лиц того же возраста. Механизм снижения МПК при ХЛЛ может быть связан со снижением антиоксидантной защиты и окислительным стрессом (ОС). Целью работы было исследовать взаимосвязь между показателями окислительного стресса, антиоксидантной защиты и показателями остеопении у пациентов с ХЛЛ. Обследовали мужчин в возрасте 50–70 лет. Группу 1 составили 14 здоровых мужчин, группу 2 — 54 пациента с ХЛЛ без изменений МПК, группу 3 — 22 пациента с ХЛЛ с признаками остеопении. На денситометре оценивали МПК, T- и Z-критерии в поясничных позвонках, шейке бедренной кости (ШПОБК), проксимальном отделе бедренной кости во всех группах. На старте исследования в сыворотке во всех группах и в гомогенате костной ткани в группах 2 и 3 определяли содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ); общий антиоксидантный статус (ОАС). Показатели остеоденситометрии, ПОЛ и ОАС в сыворотке крови во всех группах оценивали через 6 месяцев наблюдения. На старте исследования по данным остеоденситометрии у 29% больных с ХЛЛ выявлена остеопения в ШПОБК, а через 6 месяцев остеопению наблюдали во всех локализациях у 55% больных. На старте исследования у пациентов с ХЛЛ и остеопенией в сыворотке и костной ткани зафиксированы ОС и сниженный ОАС. Через 6 месяцев у пациентов с ХЛЛ и остеопенией выявлены признаки прогрессии ОС и снижения ОАС. У пациентов с ХЛЛ показатели ОС в сыворотке и костной ткани сопоставимы и могут быть использованы для прогноза возникновения остеопении через 6 месяцев.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, минеральная плотность кости, остеопения, окислительный стресс, перекисное окисление липидов, редокс-статус

Вклад авторов: М. В. Осиков — разработка идеи, концепции и дизайна работы, редактирование и утверждение окончательного варианта рукописи; Е. А. Коробкин — проведение экспериментальной части работы, статистическая обработка данных, интерпретация полученных данных, написание и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 10 апреля 2023 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Михаил Владимирович Осиков
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092, Россия; prof.osikov@yandex.ru

Статья получена: 11.10.2024 **Статья принята к печати:** 13.11.2024 **Опубликована онлайн:** 30.11.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.053

ROLE OF OXIDATIVE STRESS IN PATHOGENESIS OF BONE DESTRUCTION SYNDROME IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Osikov MV^{1,2}✉, Korobkin EA^{1,2}

¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

Reduced bone mineral density (BMD), osteopenia, and osteoporosis are slightly more common in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). The risk of osteoporotic fractures in individuals with CLL is higher, than in healthy individuals of the same age. The mechanism underlying the CLL-associated BMD reduction can be related to decreased antioxidant protection and oxidative stress (OS). The study aimed to assess the relationship between oxidative stress, antioxidant protection, and osteopenia indicators in patients with CLL. Males aged 50–70 years were examined. Group 1 consisted of 14 healthy men, group 2 consisted of 54 patients with CLL having no BMD alterations, and group 3 consisted of 22 patients with CLL having signs of osteopenia. A densitometer was used to estimate BMD, T- and Z-scores of the lumbar vertebrae, proximal femoral neck (PFN), proximal femoral bone in all groups. At the beginning of the study, the levels of lipid peroxidation (LPO) products were determined in blood serum in all groups and bone tissue homogenate in groups 2 and 3; the total antioxidant status (TAS) was also determined. Bone densitometry indicators, serum LPO and TAS were assessed in all groups after 6 months of follow-up. At the beginning of the study osteopenia in PFN based on bone densitometry data was revealed in 29% of patients, while 6 months later osteopenia of all localizations was observed in 55% of patients. At the beginning of the study patients with CLL and osteopenia showed OS and reduced TAS in both blood serum and bone tissue. After 6 months patients with CLL and osteopenia showed signs of OS progression and TAS reduction. In patients with CLL, serum and bone tissue OS indicators are comparable and can be used to predict the onset of osteopenia within 6 months.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, bone mineral density, osteopenia, oxidative stress, lipid peroxidation, redox status

Author contribution: Osikov MV — developing the study idea, concept, and design, editing and approval of the final version of the manuscript; Korobkin EA — experimental phase of the study, statistical data processing, data interpretation, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University (protocol No. 3 dated 10 April 2023). All subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail V. Osikov
Vorovsky, 64, Chelyabinsk, 454092, Russia; prof.osikov@yandex.ru

Received: 11.10.2024 **Accepted:** 13.11.2024 **Published online:** 30.11.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.053

Хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), относящийся к классу злокачественных лимфом, происходит из малых В-лимфоцитов. ХЛЛ разделяют на два клинических варианта: лимфоидная гиперплазия с клональным лимфоцитозом $\geq 5000/\text{мкл}$; гипертрофия лимфоидных органов без лимфоцитоза. Увеличение лимфоузлов, миндалин и селезенки — проявление лимфомы из малых В-лимфоцитов, которая вместе с ХЛЛ входит в одну нозологическую единицу [1]. Согласно эпидемиологической обстановке ежегодная заболеваемость ХЛЛ в Европе составляет около 5 случаев на 100 тыс., в России — около 3–4 на 100 тыс. [2]. ХЛЛ является второй по распространенности среди неходжкинских лимфом. При ХЛЛ риск снижения костной массы достигает 66%, что в дальнейшем приводит к переломам трубчатых костей и инвалидизации. Снижение минеральной плотности кости (МПК) приводит к развитию остеопороза у 16% и остеопении у 35% пациентов с ХЛЛ [3]. В динамике разрушение костного скелета при ХЛЛ начинается в проксимальных отделах бедренных костей, переходя на позвоночник и остальные кости; связано это, скорее всего, с локализацией опухолевых клеток в костном мозге тазовых костей и взаимодействием с клетками стромы [4].

Чрезмерная генерация активных форм кислорода (АФК) лейкоцитами, снижение функциональной активности антиоксидантной системы могут быть одними из ключевых механизмов потери костной массы при ХЛЛ [5]. Окислительный стресс при ХЛЛ обусловлен большим количеством митохондрий в опухолевых клетках, а их выживаемость связана с устойчивостью к окислительному стрессу и ассоциирована с высоким содержанием внутриклеточных антиоксидантов, которые связывают АФК и ингибируют апоптоз, что приводит к увеличению количества злокачественных лимфоцитов [6].

Процесс остеорезорбции связан с окислительным стрессом, в частности с воздействием АФК на молекулы белков, которое приводит к повреждению окружающих клеток в костной ткани. Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), накапливающиеся в тканях, используют как маркеры окислительного стресса при многих онкологических заболеваниях, а их уровень в тканях свидетельствует о функциональной активности антиоксидантной системы при ХЛЛ [7]. Патогенез остеодеструктивного процесса при ХЛЛ остается неясным, а анализ исследований по данной теме показал, что снижение МПК является частью комплекса событий, затрагивающего иммунную систему, внутриклеточные сигнальные пути и редокс-статус, в связи с чем требуется дальнейшее изучение механизма потери костной массы для усовершенствования диагностики и терапии у таких пациентов.

Цель работы — исследовать взаимосвязь содержания продуктов перекисного окисления липидов, антиоксидантного статуса в сыворотке и в костной ткани и показателей минеральной плотности кости у больных с ХЛЛ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России и ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница». Критерии включения в исследование: только мужчины в возрасте 50–70 лет, подписавшие информированное согласие. Критерии исключения: все заболевания и состояния, при которых доказано может снижаться МПК, а именно терминальная

почечная недостаточность, генетические заболевания (муковисцидоз, синдром Элерса-Данло, несовершенный остеогенез, порфирия и др.), заболевания эндокринной системы (сахарный диабет 1-го и 2-го типов, заболевания щитовидной железы и др.), длительное лечение глюкокортикостероидами, заболевания желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, первичный билиарный цирроз, целиакия, мальабсорбция и др.), хирургические вмешательства на ЖКТ, наличие онкогематологических заболеваний, кроме хронического лимфолейкоза, ревматологические заболевания, наличие вируса иммунодефицита человека, невозможность самообслуживания.

Контрольную группу (группа 1) составили 14 условно здоровых мужчин, группу 2 — 54 пациента с ХЛЛ с нормальными показателями костной системы и группу 3 — 22 пациента с ХЛЛ со значимым снижением МПК. Все группы были сопоставимы по возрасту ($p > 0,05$): группа 1 — 59,0 [55,7; 63,5] лет, группа 2 — 62,0 [59,7; 65,3] лет, группа 3 — 65,0 [59,0; 66,1] лет. Диагноз ХЛЛ верифицировали с помощью проточного цитофлуориметра «BD FACSCanto II» (BD Biosciences; США) методом иммунофенотипирования лимфоцитов периферической крови следующей клональности: CD5⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD23⁺, CD22⁺, CD23⁺, CD43⁺, CD200⁺, легких цепей иммуноглобулинов каппа или лямбда. Пациентов распределили по стадиям (классификация Binet): стадия А — 28 пациентов (37%), стадия В — 36 пациента (47%), стадия С — 12 пациентов (16%) [1]. Средний стаж заболевания составлял 10,5 месяцев, длительность исследования — 6 месяцев. На старте исследования оценивали показатели МПК, Т- и Z-критериев в поясничном отделе позвоночника (ПОП), шейке проксимального отдела бедренной кости (ШПОБК), проксимального отдела бедренной кости (ПОБК) на остеоденситометре «DEXXUM 3» (OsteoSys Co; Южная Корея). 10-летний риск перелома костей рассчитывали с помощью международного общепринятого инструмента оценки риска переломов Fracture Risk Assessment Tool (FRAX) [8]. Всем пациентам с ХЛЛ проводили трепанобиопсию задней верхней ости подвздошной кости для подтверждения диагноза. Биоптат костной ткани гомогенизировали в течение 3 мин при температуре 4 °С (1 : 10) с добавлением 0,9%-го раствора натрия хлорида. Содержание продуктов ПОЛ исследовали в сыворотке во всех группах и в гомогенате костной ткани у пациентов с ХЛЛ экстракционно-спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра «СФ-56» («ЛОМО-Спектр»; Россия) [9]. Определяли оптическую плотность продуктов ПОЛ в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта против соответствующего контроля при 220 нм (содержание продуктов с изолированными двойными связями), 232 нм, 278 нм, 400 нм. Результаты выражали в единицах индексов окисления (е.и.о.): E232/E220 — относительное содержание диеновых конъюгатов (ДК), E278/E220 — кетодиенов и сопряженных триенов (КД и СТ) и E400/E220 — оснований Шиффа (ШО). Общий антиоксидантный статус (ОАС) исследовали при помощи автоматического анализатора «Chem Well 2910 Combi» (Awereness Technology; США) тест-системой «В-7501 Общий антиоксидантный статус» («Вектор-Бест»; Россия), результат выражали как общее количество содержания антиоксидантов в ммоль/л.

На второй точке исследования, через 6 месяцев, во всех группах оценивали остеоденситометрические показатели, ПОЛ и ОАС в сыворотке. По результатам двух

точек исследования сгенерированы три математические модели, прогнозирующие изменения МПК на основании показателей ПОЛ, ОАС в костной ткани и сыворотке.

Результаты обрабатывали с использованием «IBM SPSS Statistics v. 23» (SPSS: An IBM Company; США), представляли в виде медианы и интерквартильного диапазона (Me [Q₁; Q₃]). Значимость различий оценивали при помощи критерия Манна–Уитни. Для сравнения медиан нескольких выборок использовали критерий Краскела–Уоллиса. Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Линейный регрессионный анализ был использован для выявления статистической зависимости между показателями. Качество моделей оценивали по коэффициенту детерминации R², характеру распределения регрессионных остатков. Корреляционный анализ был выполнен с помощью коэффициента Спирмена (R).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На момент начала исследования у 29% пациентов с ХЛЛ (группа 3) выявлено значимое снижение в поясничном отделе позвоночника Т-критерия в 4,8 раза по медиане в сравнении с группой 1, Z-критерия — на 100% по медиане, МПК — на 10% по медиане; снижение в шейке проксимального отдела бедренной кости Т-критерия — в 8 раз по медиане в сравнении с группой 1, Z-критерия — в 3 раза по медиане, МПК — на 16% по медиане; в проксимальном отделе бедренной кости снижение Т-критерия произошло в 4,2 раза по медиане, Z-критерия — в 1,3 раза, МПК — на 13% по медиане (табл. 1). В соответствии с Национальными рекомендациями, снижение Т-критерия в ШПОБК в группе 3 может быть расценено как остеопения. По сравнению с группой 2 пациенты с ХЛЛ и остеопенией имели статистически значимое снижение показателей в ПОП: Т-критерий — в 6 раз по медиане, Z-критерий — на 100%, МПК — на 13,5%; показателей в ШПОБК: Т-критерий — в 7 раз по медиане, Z-критерий — в 2,1 раза, МПК — на 15% по медиане и

показателей в ПОБК: Т-критерий — в 8 раз по медиане, Z-критерий — в 4,5 раза по медиане, МПК — на 14% по медиане. Риск десятилетней вероятности перелома костей скелета, рассчитанный по алгоритму FRAX и включающий показатель МПК во всех группах, не имел значимых различий ($p > 0,05$). В группе 2 в динамике 6-месячного наблюдения значимые изменения зафиксированы в ПОП: Т-критерий снизился в 6,5 раз по медиане, МПК — на 9% по медиане и в ШПОБК: Т-критерий снизился в 4 раз по медиане. Однако остеоденситометрические показатели, в том числе и Т-критерий в ПОП и ШПОБК, соответствовали норме по параметрам, указанным в Национальных рекомендациях. Через 6 месяцев по сравнению с группой 2 у пациентов с ХЛЛ и остеопенией были значимо снижены в ПОП: Т-критерий — в 3,7 раза по медиане, Z-критерий — в 1,05 раза, МПК — на 2% по медиане; в ШПОБК: Т-критерий — в 1,5 раза по медиане, Z-критерий — в 1,7 раз, МПК — на 13% по медиане; в ПОБК: Т-критерий — в 22 раза по медиане, Z-критерий — в 1,2 раза, МПК — на 12% по медиане. При детальном анализе динамики показателей остеоденситометрии через 6 месяцев в группе 3 показатели МПК были снижены до показателей остеопении во всех локализациях исследования: в ПОП Т-критерий был снижен в 4 раза по медиане, Z-критерий — в 0,1 раз; в ШПОБК: Т-критерий — в 1,5 раза по медиане, Z-критерий — в 1,2 раз; в ПОБК: Т-критерий — в 2,1 раза по медиане, Z-критерий — в 9,3 раза.

Окислительный стресс в костной ткани у пациентов с ХЛЛ оценивали по содержанию окисленных остатков липидных молекул и общего антиоксидантного статуса. В группе 3 на старте исследования в гептановой фазе липидного экстракта статистически значимо увеличено содержание кетодиенов и сопряженных триенов (на 5,5% по медиане по сравнению с группой 2) и оснований Шиффа (в 24 раза по медиане) (табл. 2).

В изопропанольной фазе липидного экстракта значимо увеличивается уровень оснований Шиффа (на 41% по медиане по сравнению с группой 2). Не обнаружено у больных

Таблица 1. Показатели минеральной плотности кости (Me [Q₁; Q₃])

Показатели	Группа 1 (n = 14)	Группа 2		Группа 3	
		Старт (n = 54)	6 месяцев (n = 18)	Старт (n = 22)	6 месяцев (n = 12)
FRAX, %	28,50 [25,60; 30,00]	28,00 [26,80; 30,50]	27,10 [24,20; 28,70]	28,70 [23,00; 30,10]	28,55 [26,20; 31,10]
Т-кр. ПОП, SD	1,15 [0,70; 3,00]	1,30 [-0,10; 2,50]	0,20 [-0,50; 0,80] [§]	-0,30 [-0,60; 1,00] ^{**}	-1,10 [-1,80; -1,00] ^{**&}
Z-кр. ПОП, SD	1,30 [0,80; 3,00]	1,60 [0,40; 2,90]	1,20 [0,00; 2,10]	0,00 [-1,10; 1,40] ^{**}	-1,05 [-1,20; -0,55] ^{**&}
МПК ПОП, г/см ²	1,31 [1,06; 1,36]	1,37 [1,21; 1,52]	1,24 [1,16; -1,35] [§]	1,18 [1,06; 1,34] [#]	1,15 [1,11; 1,21] [#]
Т-кр. ШПОБК, SD	0,20 [-0,20; 0,50]	-0,20 [-0,60; 0,10]	-0,80 [-1,20; -0,40] [§]	-1,40 [-2,00; -1,10] ^{**}	-2,10 [-2,30; -1,60] ^{**&}
Z-кр. ШПОБК, SD	0,90 [0,10; 1,10]	0,70 [0,40; 1,00]	0,00 [-0,40; 0,50] [§]	-0,60 [-1,00; 0,00] ^{**}	-1,00 [-1,30; -0,60] ^{**&}
МПК ШПОБК, г/см ²	1,05 [0,98; 1,10]	1,04 [0,99; 1,08]	0,96 [0,91; 1,02] [§]	0,88 [0,80; 0,93] ^{**}	0,89 [0,85; 0,92] ^{**}
Т-кр. ПОБК, SD	0,25 [-0,10; 0,50]	-0,10 [-0,30; 0,30]	-0,60 [-0,80; 0,20] [§]	-0,80 [-2,00; -0,60] ^{**}	-1,65 [-2,50; -1,20] ^{**&}
Z-кр. ПОБК, SD	0,07 [0,88; 2,40]	0,70 [0,30; 1,10]	-0,10 [-0,30; 0,30] [§]	-0,20 [-1,30; -0,10] ^{**}	-1,85 [-2,20; -1,50] ^{**&}
МПК ПОБК, г/см ²	1,07 [0,88; 1,12]	1,09 [1,05; 1,14]	1,01 [0,98; 1,05] [§]	0,93 [0,83; 1,01] [#]	0,94 [0,92; 0,97] ^{**}

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1 по критерию Краскела–Уоллиса, # — с группой 2; § — различия в группе 2; & — различия в группе 3.

Таблица 2. Показатели окислительного стресса костной ткани у больных с ХЛЛ (Ме [Q₁; Q₃])

Показатели	Группа 2 (n = 54)	Группа 3 (n = 22)
ДК (г), е.и.о.	0,609 [0,602; 0,617]	0,612 [0,608; 0,626]
КД и СТ (г), е.и.о.	0,073 [0,056; 0,077]	0,077 [0,076; 0,081] [#]
ШО (г), е.и.о.	0,003 [0,001; 0,007]	0,076 [0,038; 0,078] [#]
ДК (и), е.и.о.	0,504 [0,485; 0,526]	0,506 [0,489; 0,507]
КД и СТ (и), е.и.о.	0,104 [0,097; 0,121]	0,100 [0,095; 0,109]
ШО (и), е.и.о.	0,061 [0,047; 0,065]	0,086 [0,084; 0,094] [#]
ОАС, ммоль/л	0,88 [0,81; 1,04]	0,61 [0,49; 0,62] [#]

Примечание: [#] — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 2 по критерию U Манна–Уитни; (г) — гептановая фаза липидного экстракта костной ткани; (и) — изопропанольная фаза.

с ХЛЛ и остеопенией в гептановой и изопропанольной фазах липидного экстракта костной ткани значимых изменений концентрации диеновых конъюгатов, а также в изопропанольной фазе кетодиенов и сопряженных триенов. В костной ткани в группе 3 был значимо снижен общий антиоксидантный статус (на 30% по медиане в сравнении с группой 2).

Показатели окислительного стресса в сыворотке во всех группах представлены в табл. 3.

Установлено, что на старте исследования при сравнении с группой 2 у пациентов с ХЛЛ и снижением МПК в гептановой фазе липидного экстракта было выявлено значимое увеличение содержания диеновых конъюгатов на 14% по медиане, кетодиенов и сопряженных триенов — на 9% по медиане. В изопропанольной фазе в сыворотке определялось значимо высокое содержание диеновых конъюгатов (на 15% по медиане), кетодиенов и сопряженных триенов (на 13% по медиане), однако ШО были снижены на 20% по медиане. В группе 3 был значимо снижен общий антиоксидантный статус в сыворотке на старте исследования на 47% по медиане в сравнении с группой 2.

В группе 3 по сравнению с группой 2 через 6 месяцев наблюдения выявлено значимое увеличение в гептановой фазе липидного экстракта сыворотки диеновых конъюгатов на 28%, кетодиенов и сопряженных триенов — на 29% и оснований Шиффа — на 31% по медиане, а в изопропанольной фазе диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов — на 29% и оснований Шиффа —

на 28% по медиане. ОАС в группе 3 через 6 месяцев наблюдения был значимо ниже на 74% по медиане в сравнении с группой 2.

На старте исследования в группе 3 при сравнении с группой 1 в гептановой фазе липидного экстракта сыворотки зафиксированы значимо увеличенные концентрации диеновых конъюгатов, кетодиенов и сопряженных триенов на 98%, оснований Шиффа на 95%, в изопропанольной фазе ДК, КД и СТ на 92%, ШО на 62% по медианам. В группе 3 ОАС был снижен на 53% по медиане в сравнении с группой 1.

Через 6 месяцев при сравнении с группой 1 в гептановой фазе липидного экстракта у пациентов с ХЛЛ и остеопенией значимо увеличивались концентрации сывороточных ДК на 98,7%, КД и СТ — на 99% и ШО — на 96% по медиане, в изопропанольной фазе ДК — на 96%, КД и СТ — на 98% и ШО — на 86% по медиане. ОАС сыворотки в группе 3 через 6 месяцев значимо снизился на 73% по сравнению с группой 1.

Через 6 месяцев в группе 3 в гептановой фазе значимо увеличивались концентрации ДК, КД и СТ в сыворотке крови на 40% по медиане, в изопропанольной фазе экстракта ДК — на 53% по медиане, КД и СТ — на 74,5% и ШО — на 64%. Также в группе 3 в динамике шестимесячного наблюдения снижался ОАС в сыворотке (на 43% по медиане).

При использовании математического моделирования с применением критерия Спирмена выявлена значимая отрицательная взаимосвязь изменений минеральной

Таблица 3. Показатели окислительного стресса в сыворотке (Ме [Q₁; Q₃])

Показатели	Группа 1 (n = 14)	Группа 2		Группа 3	
		Старт (n = 54)	6 месяцев (n = 18)	Старт (n = 22)	6 месяцев (n = 12)
ДК (г), е.и.о.	0,014 [0,013; 0,014]	0,582 [0,561; 0,613] [*]	0,800 [0,776; 0,804] ^{*s}	0,679 [0,534; 0,680] ^{*#}	1,126 [1,087; 1,309] ^{*#&}
КД и СТ (г), е.и.о.	0,001 [0,001; 0,002]	0,088 [0,077; 0,093] [*]	0,114 [0,109; 0,139] ^{*s}	0,097 [0,092; 0,103] ^{*#}	0,161 [0,137; 0,193] ^{*#&}
ШО (г), е.и.о.	0,003 [0,002; 0,004]	0,058 [0,040; 0,062] [*]	0,061 [0,026; 0,096] [*]	0,075 [0,048; 0,075] [*]	0,089 [0,043; 0,135] ^{*#}
ДК (и), е.и.о.	0,049 [0,047; 0,051]	0,518 [0,500; 0,527] [*]	0,932 [0,912; 0,942] ^{*s}	0,611 [0,608; 0,624] ^{*#}	1,312 [1,286; 1,547] ^{*#&}
КД и СТ (и), е.и.о.	0,025 [0,023; 0,027]	0,267 [0,235; 0,281] [*]	0,847 [0,829; 0,856] ^{*s}	0,305 [0,293; 0,317] ^{*#}	1,193 [1,169; 1,407] ^{*#&}
ШО (и), е.и.о.	0,012 [0,011; 0,016]	0,039 [0,033; 0,047] [*]	0,062 [0,041; 0,074] ^{*s}	0,031 [0,026; 0,046] ^{*#}	0,087 [0,042; 0,105] ^{*#&}
ОАС, ммоль/л	1,97 [1,89; 2,27]	1,73 [1,54; 2,01] [*]	2,03 [1,78; 2,35] ^s	0,91 [0,85; 0,94] [#]	0,53 [0,43; 0,54] ^{*#&}

Примечание: ^{*} — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1 по критерию Краскела–Уоллиса, [#] — с группой 2; ^s — различия в группе 2; [&] — различия в группе 3; (г) — гептановая фаза липидного экстракта костной ткани; (и) — изопропанольная фаза.

Таблица 4. Регрессионные модели

Модели	Признаки	Коэффициенты	<i>p</i>
Модель связи МПК ШПОБК с ПОЛ в сыворотке на старте adjusted R ² = 0,34; <i>p</i> = 0,001	Intercept	1,396	< 0,001*
	ДК (г)	-0,620	0,00156*
Модель связи ПОЛ в кости с ПОЛ в сыворотке на старте adjusted R ² = 0,36; <i>p</i> = 0,003	Intercept	0,49817	< 0,001*
	КД и СТ (г)	-0,40958	0,03754*
	ШО (г)	0,66482	0,00107*
Модель определения МПК ПОПБК через 6 месяцев по показателям ПОЛ сыворотки adjusted R ² = 0,71; <i>p</i> = 0,002	Intercept	2,39	< 0,001*
	ДК (г)	-1,99	0,024*
	ШО (и)	-3,12	0,017*
Группа 3		0,27	0,128

Примечание: * — статистически значимые (*p* < 0,05) различия

плотности костной ткани в шейке бедренной кости и уровнем диеновых конъюгатов в гептановой фазе липидного экстракта сыворотки на старте исследования (табл. 4). Модель можно описать следующим уравнением:

$$x = 1,396 - 0,62 \times \text{ДК (г)},$$

где *x* — показатель МПК ШПОБК, ДК (г) — диеновые конъюгаты в гептановой фазе.

Метод линейного регрессионного анализа позволил сопоставить показатели окислительной деструкции липидов в костной ткани с показателями ПОЛ в сыворотке крови на момент начала наблюдения с помощью математического моделирования, что позволило отказаться от повторного исследования редокс-статуса костной ткани в динамике и исключить дополнительную медицинскую травматизацию пациентов, связанную с проведением трепанобиопсии гребня подвздошной кости. Модель можно описать следующим уравнением:

$$x = 0,5 - 0,41 \times \text{КД и СТ (г)} + 0,66 \times \text{ШО (г)},$$

где *x* — концентрация диеновых конъюгатов в костной ткани в изопропанольной фазе, КД и СТ (г) — кетодиены и сопряженные триены в гептановой фазе, ШО (г) — основания Шиффа в гептановой фазе.

Согласно другой модели, уровни сывороточных диеновых конъюгатов в гептановой и оснований Шиффа в изопропанольной фазах экстракта на момент начала исследования имели значимую отрицательную взаимосвязь с уровнем МПК ПОПБК через 6 месяцев после начала наблюдения. Модель можно описать следующим уравнением:

$$x = 2,39 - 1,99 \times \text{ДК (г)} - 3,12 \times \text{ШО (и)} + 0,27 \times \text{Остеопения},$$

где *x* — вероятность снижения МПК ПОБК (г/см²), ДК (г) — диеновые конъюгаты в гептановой фазе, ШО (и) — основания Шиффа в изопропанольной фазе. Признак наличия остеопении был включен в модель, так как улучшал качество прогноза, но не показал статистической значимости (1 — есть, 0 — нет).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стандартизованным показателем при проведении остеоденситометрии считается Т-критерий, он представляет собой количество стандартных отклонений от максимальной МПК, используется у женщин в постменопаузе и мужчин старше 50 лет. Z-критерий представляет количество

стандартных отклонений от среднего показателя МПК у лиц той же возрастной группы [8].

При ХЛЛ наиболее распространенной локализацией снижения МПК считается шейка бедренной кости. Однако при тяжелых стадиях заболевания изменения показателей МПК могут обнаруживаться в других областях скелета, включая позвоночник [4].

Механизм развития остеопении в той или иной локализации, вероятно, связан с негативным влиянием большого количества свободных радикалов, синтезируемых опухолевыми клетками, на молекулы белков и липидов и образованием продуктов вследствие их окислительной деструкции [10, 11].

Как известно, диеновые конъюгаты, кетодиены и сопряженные триены являются продуктами ранних стадий перекисной окисления липидов. Их концентрация отражает активность процессов ПОЛ и интенсивность окислительного стресса. Шиффовы основания не подвергаются метаболизму и являются маркерами дистрофических процессов в клетках и тканях. Биомаркерами окислительного стресса в тканях при ХЛЛ в настоящее время принято считать карбонильные остатки окисленных липидов, образующиеся после гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот, например 4-гидроксиноненаль или малоновый диальдегид [7]. Выживание клональных В-клеток связано с окислительным фосфорилированием (превращением АФК в менее вредные формы), усилением антиокислительной защиты, а именно активацией изоформ супероксиддисмутазы (SOD, SOD1 (Cu/Zn SOD), SOD2 (Mn-SOD)), системы тиоредоксина и ферментного каскада, индуцирующего биосинтез и рециркуляцию глутатиона [12]. АФК при ХЛЛ преимущественно синтезируются в митохондриях в отличие от других опухолей, где эту функцию выполняют НАДФН-оксидазы [12]. АФК буферизируются под действием антиоксидантных факторов, экспрессия которых находится под контролем факторов транскрипции, регулирующих окисление и фосфорилированием [12]. Окислительный стресс рассматривают как основной механизм потери костной массы [13–15]. Окислительный стресс опосредованно, через активацию сигнальных путей (FGF23, Nrf-2, JNK, ERK1/2, NF-κB, RANKL/OPG) стимулирует дифференцировку остеокластов, влияет на пролиферацию и продолжительность жизни, снижает активность остеобластов и участвует в их апоптозе [15]. В частности, при избыточной экспрессии Nrf-2, активации гемоксигеназы-1 (HO-1) и RUNX2-зависимой транскрипционной активности при ХЛЛ снижается дифференцировка остеобластов [16, 17]. Так же механизм снижения минерализации костной ткани в условиях окислительного стресса связан с повышенной экспрессией

FGF23 в костной ткани из-за апоптоза остеоцитов и остеобластов, активации митоген-активированных протеинкиназ (МАРК) [18, 19].

Как следствие, в результате окислительного стресса, индуцированного опухолью, зрелые остеокласты резорбируют костный матрикс, позволяя опухолевым клеткам расти и мигрировать в тканях. Дисфункция антиоксидантной защиты при ХЛЛ способствует апоптозу остеобластов и остеоцитов, вызывая еще большее снижение МПК, ведущее к остеопении и остеопорозу [20].

На основе полученных данных нами была создана компьютерная программа «Моделирование изменений минеральной плотности кости в зависимости от редокс-статуса у пациентов с хроническим лимфолейкозом», позволяющая спрогнозировать развитие остеопении или остеопороза у пациентов с ХЛЛ за период в 6 месяцев в зависимости от показателей ПОЛ сыворотки. Апробация данной модели по результатам наших исследований позволила продемонстрировать высокую чувствительность и специфичность созданной программы и имела высокое прогностическое значение. Практическое применение программы специалистами здравоохранения позволит выделить подгруппу пациентов с ХЛЛ у которых может возникнуть остеопения.

ВЫВОДЫ

У больных с ХЛЛ с частотой 29% выявляется остеопения по данным остеоденситометрии в шейке проксимального отдела бедренной кости. В динамике

шестимесячного наблюдения признаки остеопении определяются уже у 55% больных во всех локализациях инструментального исследования. У больных ХЛЛ и остеопенией в костной ткани наблюдаются признаки окислительного стресса: накапливаются в гептановой фазе липидного экстракта вторичные и конечные продукты, в изопропанольной фазе — конечные продукты окисления липидов, снижается общий антиоксидантный статус. Так же у пациентов с ХЛЛ и остеопенией констатирован системный окислительный стресс, который сопровождается повышенной концентрацией первичных и вторичных продуктов окислительной деструкции липидов в гептановой фазе, первичных, вторичных и конечных продуктов в изопропанольной фазе, сниженным общим антиоксидантным статусом в сыворотке крови. Через 6 месяцев относительно показателей на старте исследования зафиксировано прогрессирование окислительного стресса в сыворотке крови: увеличивается содержание первичных, вторичных и конечных продуктов окислительной деструкции липидов в гептановой и изопропанольной фазах, снижается общий антиоксидантный статус. Показатели редокс-статуса в сыворотке крови и костной ткани достоверно сопоставимы, а сывороточные показатели окислительного стресса могут использоваться для прогноза возникновения остеопении. Проведенное исследование может оказать влияние на выбор тактики ведения пациентов, подготовить лечебно-профилактические мероприятия, например назначение антиоксидантной терапии или терапии бисфосфонатами.

Литература

1. Никитин Е. А., Бялик Т. Е., Зарицкий А. Ю., Исебер Л., Капланов К. Д., Лопаткина Т. Н., и др. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации. Современная Онкология. 2020; 22 (3): 24–44. DOI: 10.26442/18151434.2020.3.200385.
2. Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О., Лисичникова И. В. Злокачественные новообразования в России в 2022 году (заболеваемость и смертность). М-во здравоохранения Российской Федерации, МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии». Москва: Коллектив авторов, 2023; 275 с.
3. Petty L, Stephens D, Sharma A. Risk Factors for Fragility Fractures in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cureus*. 2024; 16 (2): e54774. DOI: 10.7759/cureus.54774.
4. Giannoni P, Marini C, Cutrona G, Sambuceti GM, Fais F, de Totero D. Unraveling the Bone Tissue Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2023; 15 (20): 5058. DOI: 10.3390/cancers15205058.
5. D'Arena G, Seneca E, Migliaccio I, De Feo V, Giudice A, La Rocca F, et al. Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia: still a matter of debate. *Leuk Lymphoma*. 2019; 60 (4): 867–5. DOI: 10.1080/10428194.2018.1509317.
6. Sciacotta R, Gangemi S, Penna G, Giordano L, Poggia G, Allegra A. Potential New Therapies "ROS-Based" in CLL: An Innovative Paradigm in the Induction of Tumor Cell Apoptosis. *Antioxidants (Basel)*. 2024; 13 (4): 475. DOI: 10.3390/antiox13040475.
7. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwaseel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023; 97 (10): 2499–574. DOI: 10.1007/s00204-023-03562-9.
8. Белая Ж. Е., Белова К. Ю., Бирюкова Е. В., Дедов И. И., Дзеранова Л. К., Дралкина О. М., и др. Федеральные клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике остеопороза. Остеопороз и остеопатии. 2021; 24 (2): 4–47. DOI: org/10.14341/osteo12930.
9. Волчегорский И. А., Долгушин И. И., Колесников О. Л., Цейликман В. Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: ЧелГПУ, 2000; 167 с.
10. Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskalyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem*. 2023; 11: 1158198. DOI: 10.3389/fchem.2023.1158198.
11. Zhivodernikov IV, Kirichenko TV, Markina YV, Postnov AY, Markin AM. Molecular and Cellular Mechanisms of Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (21): 15772. DOI: 10.3390/ijms242115772.
12. Pagano MA, Frezzato F, Visentin A, Trentin L, Brunati AM. Protein Phosphorylation and Redox Status: An as Yet Elusive Dyad in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (19): 4881. DOI: 10.3390/cancers14194881.
13. Han J, Yang K, An J, Jiang N, Fu S, Tang X. The Role of NRF2 in Bone Metabolism — Friend or Foe? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 813057. DOI: 10.3389/fendo.2022.813057.
14. Ma F, Luo S, Lu C, Jiang X, Chen K, Deng J, et al. The role of Nrf2 in periodontal disease by regulating lipid peroxidation, inflammation and apoptosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 963451. DOI: 10.3389/fendo.2022.963451.
15. Marcucci G, Domazetovic V, Nedjani C, Ruzzolini J, Favre C, Brandi ML. Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Osteoporosis: Novel Preventive and Therapeutic Approaches. *Antioxidants (Basel)*. 2023; 12 (2): 373. DOI: 10.3390/antiox12020373.
16. Gao Y, Patil S, Jia J. The Development of Molecular Biology of Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (15): 8182. DOI: 10.3390/ijms22158182.
17. Zhou X, Yuan W, Xiong X, Zhang Z, Liu J, Zheng Y, et al. HO-1 in Bone Biology: Potential Therapeutic Strategies for Osteoporosis. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 791585. DOI: 10.3389/fcell.2021.791585.

18. Vervloet MG. Shedding Light on the Complex Regulation of FGF23. *Metabolites*. 2022; 12 (5): 401. DOI: 10.3390/metabo12050401.
19. Domazetovic V, Falsetti I, Ciuffi S, Iantomasi T, Marcucci G, Vincenzini MT, et al. Effect of Oxidative Stress-Induced Apoptosis on Active FGF23 Levels in MLO-Y4 Cells: The Protective Role of 17- β -Estradiol. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (4): 2103. DOI: 10.3390/ijms23042103.
20. El-Gazzar A, Högler W. Mechanisms of Bone Fragility: From Osteogenesis Imperfecta to Secondary Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (2): 625. DOI: 10.3390/ijms22020625.

References

- Nikitin EA, Bjalik TE, Zarickij AYu, Iseber L, Kaplanov KD, Lopatkina TN, i dr. Hronicheskiy limfocitarniy lejkoz/limfoma iz malyh limfocitov. *Klinicheskie rekomendacii. Sovremennaja Onkologija*. 2020; 22 (3): 24–44. DOI: 10.26442/18151434.2020.3.200385. Russian.
- Kaprin AD, Starinskij VV, Shahzadova AO, Lisichnikova IV. Zlokachestvennye novoobrazovaniya v Rossii v 2022 godu (zabolevaemost' i smertnost'). M-vo zdravoochraneniya Rossijskoj Federacii, MNIOL im. P.A. Gercena — filial FGBU «NMIC radiologii». Moskva: Kollektiv avtorov, 2023; 275 s. Russian.
- Petty L, Stephens D, Sharma A. Risk Factors for Fragility Fractures in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cureus*. 2024; 16 (2): e54774. DOI: 10.7759/cureus.54774.
- Giannoni P, Marini C, Cutrona G, Sambuceti GM, Fais F, de Toter D. Unraveling the Bone Tissue Microenvironment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2023; 15 (20): 5058. DOI: 10.3390/cancers15205058.
- D'Arena G, Seneca E, Migliaccio I, De Feo V, Giudice A, La Rocca F, et al. Oxidative stress in chronic lymphocytic leukemia: still a matter of debate. *Leuk Lymphoma*. 2019; 60 (4): 867–5. DOI: 10.1080/10428194.2018.1509317.
- Sciaccotta R, Gangemi S, Penna G, Giordano L, Ploggia G, Allegra A. Potential New Therapies "ROS-Based" in CLL: An Innovative Paradigm in the Induction of Tumor Cell Apoptosis. *Antioxidants (Basel)*. 2024; 13 (4): 475. DOI: 10.3390/antiox13040475.
- Jomova K, Raptova R, Alomari SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023; 97 (10): 2499–574. DOI: 10.1007/s00204-023-03562-9.
- Belaja ZhE, Belova KYu, Birjukova EV, Dedov II, Dzeranova LK, Drapkina OM, i dr. Federal'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike, lecheniju i profilaktike osteoporoza. *Osteoporoz i osteopatii*. 2021; 24 (2): 4–47. DOI: org/10.14341/osteo12930. Russian.
- Volchegorskij IA, Dolgushin II, Kolesnikov OL, Cejlikman VYe. Jeksperimental'noe modelirovanie i laboratornaja ocenka adaptivnyh reakcij organizma. *Cheljabinsk: ChelGPU*, 2000; 167 s. Russian.
- Chaudhary P, Janmeda P, Docea AO, Yeskaliyeva B, Abdull Razis AF, Modu B, et al. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Front Chem*. 2023; 11: 1158198. DOI: 10.3389/fchem.2023.1158198.
- Zhivodernikov IV, Kirichenko TV, Markina YV, Postnov AY, Markin AM. Molecular and Cellular Mechanisms of Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (21): 15772. DOI: 10.3390/ijms242115772.
- Pagano MA, Frezzato F, Visentin A, Trentin L, Brunati AM. Protein Phosphorylation and Redox Status: An as Yet Elusive Dyad in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (19): 4881. DOI: 10.3390/cancers14194881.
- Han J, Yang K, An J, Jiang N, Fu S, Tang X. The Role of NRF2 in Bone Metabolism — Friend or Foe? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 813057. DOI: 10.3389/fendo.2022.813057.
- Ma F, Luo S, Lu C, Jiang X, Chen K, Deng J, et al. The role of Nrf2 in periodontal disease by regulating lipid peroxidation, inflammation and apoptosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 963451. DOI: 10.3389/fendo.2022.963451.
- Marcucci G, Domazetovic V, Nediani C, Ruzzolini J, Favre C, Brandi ML. Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Osteoporosis: Novel Preventive and Therapeutic Approaches. *Antioxidants (Basel)*. 2023; 12 (2): 373. DOI: 10.3390/antiox12020373.
- Gao Y, Patil S, Jia J. The Development of Molecular Biology of Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (15): 8182. DOI: 10.3390/ijms22158182.
- Zhou X, Yuan W, Xiong X, Zhang Z, Liu J, Zheng Y, et al. HO-1 in Bone Biology: Potential Therapeutic Strategies for Osteoporosis. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 791585. DOI: 10.3389/fcell.2021.791585.
- Vervloet MG. Shedding Light on the Complex Regulation of FGF23. *Metabolites*. 2022; 12 (5): 401. DOI: 10.3390/metabo12050401.
- Domazetovic V, Falsetti I, Ciuffi S, Iantomasi T, Marcucci G, Vincenzini MT, et al. Effect of Oxidative Stress-Induced Apoptosis on Active FGF23 Levels in MLO-Y4 Cells: The Protective Role of 17- β -Estradiol. *Int J Mol Sci*. 2022; 23 (4): 2103. DOI: 10.3390/ijms23042103.
- El-Gazzar A, Högler W. Mechanisms of Bone Fragility: From Osteogenesis Imperfecta to Secondary Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (2): 625. DOI: 10.3390/ijms22020625.

МИКРОРЕКОНСТРУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОДШИВАНИЯ ИНТРАОКУЛЯРНОЙ ЛИНЗЫ К РАДУЖКЕ С ПОЛНЫМ СОХРАНЕНИЕМ ЕЕ ФУНКЦИЙ

Х. П. Тахчиди ✉

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

Имплантация интраокулярной линзы (ИОЛ) в капсульный мешок на сегодняшний день признана стандартом в хирургическом лечении пациентов с катарактой и афакией различного генеза. Несмотря на это существует ряд причин и состояний, при которых имплантация линзы в капсульную сумку не представляется возможной или связана с высоким риском ее нестабильной фиксации: несостоятельность связочного аппарата хрусталика, разрушение цинновых связок, в том числе дислокация комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» в послеоперационном периоде; повреждение или удаление капсульного мешка во время операции, а также его отсутствие или разрушение при имплантации на афакичных глазах. На сегодняшний день проблемы фиксации и центрации ИОЛ в случаях нестандартных ситуаций, связанных с несостоятельностью или отсутствием «капсульной поддержки», остаются нерешенными. Целью исследования было разработать технологии подшивания ИОЛ к радужке с полным сохранением ее функций, при различных ситуациях несостоятельности или отсутствии возможности фиксации и центрации линзы в капсульном мешке. Пациенты ($n = 12$; 12 глаз) в зависимости от клинической ситуации были разделены на группы: группа 1 — дислокации комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» (6 глаз); группа 2 — полное отсутствие «капсульной поддержки» (3 глаза); группа 3 — несостоятельность «капсульной поддержки» (3 глаза). Для каждой ситуации из этих трех групп была разработана отдельная технология подшивания. В результате проведенного лечения получены высокие клинико-функциональные результаты за счет надежной фиксации и высококачественной центрации ИОЛ, а также полного сохранения объема функций и косметических свойств радужки.

Ключевые слова: несостоятельность или отсутствие капсульной поддержки, дислокация ИОЛ, разрушение связочного аппарата хрусталика, афакия, авитрия

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено (протокол № 239 от 15 апреля 2024 г.), от пациента получено добровольное информированное согласие на хирургическое лечение и обработку персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Христо Периклович Тахчиди
Волоколамское шоссе, д. 30, корп. 2, г. Москва, 123182, Россия; hpt1301@gmail.com

Статья получена: 14.10.2024 **Статья принята к печати:** 15.11.2024 **Опубликована онлайн:** 18.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.057

INTRAOCULAR LENS STITCHING TO IRIS WITH FULL PRESERVATION OF ITS FUNCTIONS: MICRORECONSTRUCTIVE TECHNIQUES

Takhchidi KhP ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Today, implantation of an intraocular lens (IOL) into the capsular bag is the standard approach to surgical treatment of cataracts and aphakia of various origins. However, there are several reasons and conditions that disallow this operation or increase the risk of instability of the implanted lens, such as reasons and conditions including weakness of the lens ligaments; degradation of Zinn's zonule, including dislocation of the IOL–capsular bag complex post-surgery; damage to or removal of capsular bag during surgery; lack of capsular bag or its destruction during implantation in aphakia cases. To date, problems associated with fixation and centralization of IOL in non-standard cases involving weak or inexistent capsular support remain unresolved. This study aimed to develop techniques allowing to stitch IOL to the iris without compromising its functions in various situations when it is unfeasible or impossible to fix and center lens in the capsular bag. The patients ($n = 12$; 12 eyes), depending on the clinical situation, were divided into groups: group 1 — dislocations of the IOL–capsular bag complex (6 eyes); group 2 — complete lack of capsular support (3 eyes); group 3 — weakness of capsular support (3 eyes). A special stitching technique was developed for each of these situations. The results of the treatment were good from clinical and functional perspectives: the IOL was fixed securely and centered properly, and the iris's performance and cosmetic aspects were not compromised.

Keywords: lack or weakness of capsular support, IOL dislocation, destruction of lens ligaments, aphakia, avitria

Compliance with ethical standards: the study was approved (Minutes #239 of April 15, 2024), and the patients voluntarily consented to surgical treatment and processing of personal data.

✉ **Correspondence should be addressed:** Khristo Periklovich Takhchidi
Volokolamskoe shosse, 30, korp. 2, Moscow, 123182, Russia; hpt1301@gmail.com

Received: 14.10.2024 **Accepted:** 15.11.2024 **Published online:** 18.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.057

Имплантация заднекамерной интраокулярной линзы (ИОЛ) в капсульный мешок на сегодняшний день признана стандартом в хирургическом лечении пациентов с катарактой и афакией различного генеза [1]. Однако существует ряд причин и состояний, по которым имплантация ИОЛ в капсульную сумку не представляется возможной или связана с высоким риском ее нестабильной фиксации: несостоятельность связочно-капсульного аппарата хрусталика в результате интраоперационных осложнений при удалении катаракты; афакии с отсутствующим или разрушенным капсульным мешком; травмы глаза

различного генеза; подвывихи/вывихи хрусталика, а также ряд врожденных заболеваний [2–5].

Несостоятельность связочного аппарата хрусталика может быть врожденной (синдром Морфана, синдром Вайля–Марчезани, гомоцистинурия, доминантная сферофакция и др.) [6, 7] и приобретенной (последствия травмы, глаукомы, псевдоэкзофалиативного синдрома, миопии высокой степени и др.) [8–11]. По данным различных авторов, несостоятельность связочного аппарата у пациентов с катарактой составляет 15–20% [2, 12, 13]. Помимо этого, у 20% пациентов выявляется

скрытая слабость, которую не всегда удается выявить предоперационно [12, 13]. Дефекты волокон цинновой связки, выявленные уже на операционном столе, нередко заставляют хирурга менять тактику операции и срочно решать проблему выбора ИОЛ с адекватной в данной ситуации фиксацией [14–16].

Отсутствие осложнений, связанных со связочным аппаратом хрусталика, в ходе хирургии катаракты не исключает их развитие в отсроченном послеоперационном периоде [2, 17]. Дислокации комплекса «ИОЛ – капсульный мешок» — одно из наиболее серьезных и прогностически неблагоприятных осложнений в позднем послеоперационном периоде хирургии катаракты, возникающих с частотой 0,2–2,8% в различные сроки наблюдения после операции [18–21]. Изменение правильного анатомо-топографического положения комплекса «ИОЛ – капсульный мешок» может происходить при несостоятельности связочного аппарата хрусталика, капсульного мешка или его фибрирования [22]. К основным причинам, приводящим к несостоятельности связочного аппарата хрусталика, относят: псевдоэксфолиативный синдром, осевую миопию высокой степени, наличие травм глазного яблока различного характера, предшествующее витреоретинальное вмешательство, пигментный ретинит, сахарный диабет, а также различные заболевания соединительной ткани [15, 23–25]. Единого мнения относительно оптимального метода лечения дислокации ИОЛ в этих ситуациях в настоящее время не существует. В целом, можно выделить два подхода при устранении дислокации: репозицию дислоцированной ИОЛ или замену ИОЛ с последующей ее фиксацией к склере или радужке [22].

Смещение комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» относительно зрительной оси не только снижает зрительные функции оперированного глаза, но и приводит к развитию тяжелых осложнений, таких как: офтальмогипертензия, вторичная глаукома, дистрофия роговицы, вялотекущий иридоциклит [26]. Кроме того, полная дислокация ИОЛ в задний отрезок глаза может приводить к серьезным осложнениям в этой зоне: рецидивирующему гемофтальму, деструкции стекловидного тела с формированием патологических адгезии и тракции, эпиретинального фиброза и отслойки сетчатки [27, 28]. Все перечисленные осложнения достаточно прогнозируемы и требуют превентивных мероприятий.

Наличие афакии при полном или частичном отсутствии капсулярной поддержки также представляет сложную задачу для офтальмохирургов. Выбор оптимального метода имплантации ИОЛ при этих ситуациях на сегодняшний день остается также обсуждаемым.

Переднекамерные ИОЛ с фиксацией в углу передней камеры глаза или на радужке отличаются легкостью установки, однако для них характерно наличие таких нежелательных проявлений, как повышенный уровень оптических aberrаций, анизейкония, видимый блеск от краев линзы, ограниченный объем подвижности зрачка, развитие хронического увеита и глаукомы, высокий риск потери эндотелиальных клеток с последующим развитием буллезной кератопатии [8, 29].

При склеральной фиксации ИОЛ восстанавливается почти естественная иридохрусталиковая диафрагма, исключается контакт линзы с эндотелием роговицы и структур переднего отрезка глаза, что снижает риск развития дистрофии роговицы, глаукомы и хронического воспаления. Несмотря на достоинства, транссклеральное

подшивание — это технически более сложный метод, связанный с отсутствием визуального контроля и, соответственно, возможности учета индивидуальных анатомо-топографических особенностей строения глаза в зоне фиксации ИОЛ. Вследствие этого возникает непрогнозируемая вариабельность положения (наклона) и подвижности (ротации) ИОЛ относительно зрительной оси, отражающаяся на показателях и качестве зрения, — чаще встречаются прорезывание и биодеструкция фиксирующих элементов, развитие кровоизлияний, гемофтальма, отслойки сетчатки, эндофтальмита [30].

Подшивание ИОЛ за опорные элементы к радужной оболочке технически является наиболее отработанной и привычной манипуляцией для офтальмохирурга. Основное условие для выполнения этой методики — отсутствие измененной ткани радужной оболочки (например, вследствие травм, увеитов, аниридии, дистрофии и т. д.). Основными преимуществами являются: лучшая визуализация офтальмохирургического процесса: возможность выполнения подшивания через малые самогерметизирующиеся разрезы; совмещение плоскости ИОЛ и плоскости радужки обеспечивает отсутствие эффекта «наклона» и «ротации» линзы и, соответственно, достижения более высоких показателей и качества зрения; более низкая степень биодеструкции шовного материала; возможность применения различных моделей эластичных ИОЛ. Среди самых частых осложнений метода можно выделить гифему, иридодиализ, травматизацию радужной оболочки, деформацию формы зрачка и нарушение функций радужки [31, 32].

Таким образом проблемы фиксации и центрации ИОЛ при нестандартных ситуациях во время операции или в отдаленном послеоперационном периоде, связанные с несостоятельностью или отсутствием «капсульной поддержки», остаются нерешенными. На сегодняшний день остается актуальной разработка доступных, безопасных, надежных и максимально сохраняющих функции структур глаза технологий фиксации и центрации ИОЛ в ряде случаев: несостоятельности связочного аппарата хрусталика, в том числе дислокации комплекса «ИОЛ – капсульный мешок» в послеоперационном периоде; повреждении или удалении капсульного мешка во время операции по поводу катаракты и при имплантации на афакичных глазах, в том числе сопровождающихся разрушением передней гиаловидной мембраны, с частичной или полной потерей стекловидного тела.

Целью исследования была разработка микроконструктивных технологий подшивания ИОЛ к радужке с полным сохранением ее функций при различных ситуациях несостоятельности или отсутствии возможности фиксации и центрации линзы за счет «капсульной поддержки».

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 12 пациентов (12 глаз) в возрасте 53–85 лет (средний возраст — $67,4 \pm 11,7$ лет), прооперированных в Научно-исследовательском центре офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова.

Критерии включения: дислокация комплекса «ИОЛ — капсульный мешок»; полное отсутствие «капсульной поддержки» (отсутствие капсульного мешка с разрушением передней гиаловидной мембраны, с частичной или полной потерей стекловидного тела); несостоятельность «капсульной поддержки» (неполное разрушение целостности связочного аппарата и/или капсульного мешка хрусталика).

Критерии исключения: дистрофии и помутнения роговицы, затрудняющие визуализацию переднего отрезка глаза; дистрофии радужной оболочки; врожденные и приобретенные дефекты радужной оболочки; глаукома (первичная открытоугольная глаукома, закрытоугольная глаукома, вторичная глаукома); диабетическая ретинопатия; дистрофические заболевания глазного дна (центральная хориоретинальная дистрофия сетчатки, возрастная макулярная дистрофия «сухая» и «влажная» формы); окклюзии сосудов сетчатки, острые воспалительные заболевания глазного яблока; внутриглазные образования.

Значимая сопутствующая соматическая патология, которая могла бы повлиять на полученные результаты оценки функционального состояния зрительного анализатора, отсутствовала.

Всем пациентам было проведено комплексное офтальмологическое обследование, включающее стандартные методы исследования: визометрию с определением некорригированной остроты зрения (НКОЗ) и максимально корригированной остроты зрения (МКОЗ), пневмотонометрию (СТ-80 Торсон, Япония), биомикроскопию (Carl Zeiss SL 120, Германия), офтальмоскопию с помощью бесконтактной линзы MaxField (Ocular Inc., США) и специальные методы исследования, такие как ультразвуковое исследование (УЗИ) глазного яблока (Quantel Compact Touch AB, Франция), пупиллография с помощью корнеального топографа (C.S.O. Sirius, Италия).

Обработку результатов проводили с помощью стандартных инструментов описательной статистики Microsoft Office Excel. Данные представлены в виде $M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение.

В зависимости от клинической ситуации пациенты были разделены на следующие группы: группа 1 — дислокация комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» (6 глаз); группа 2 — полное отсутствие «капсульной поддержки» (3 глаза); группа 3 — несостоятельность «капсульной поддержки» (3 глаза).

Под дислокацией комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» мы принимали смещение комплекса в отдаленном послеоперационном периоде вследствие разрыва и растяжения связочного аппарата хрусталика. При этом комплекс перемещается в плоскости параллельно плоскости радужки и может также перемещаться в плоскости оси глаза (для этого пациента исследуют в положении «лежа на спине»).

Под полным отсутствием «капсульной поддержки» мы принимали ситуации отсутствия капсульного мешка с разрушением передней гиалоидной мембраны, с частичной или полной потерей стекловидного тела.

Под несостоятельностью «капсульной поддержки» мы принимали ситуации различной степени неполного разрушения целостности связочного аппарата и/или капсульного мешка хрусталика, создающих во время операции опасность риска миграции ИОЛ в витреальную полость.

Период наблюдения — от 6 месяцев до 2 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследование группы 1

Средняя НКОЗ составила $0,43 \pm 0,17$, средняя МКОЗ — $0,63 \pm 0,19$, средний показатель ВГД — $18,1 \pm 2,5$ мм рт. ст.

При биомикроскопии были выявлены иридоноез со смещением комплекса «ИОЛ — капсульный мешок»

относительно плоскости радужки с появлением в зоне зрачка на разных уровнях края оптики и элементов гаптики ИОЛ. В положении пациента «лежа на спине» отмечались перемещение комплекса в плоскости оси глаза от незначительного до практически вертикального. На этом этапе важно определить проекцию меридианов расположения оснований гаптических элементов ИОЛ.

Для ситуации смещения комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» была выполнена разработанная нами технология (патент № RU 2817077 C1, 09.04.2024. Приоритет 07.04.2023).

Интраоперационно дополнительно определяли топографию перемещенного комплекса и проекции меридианов гаптических элементов. Нужно иметь в виду, что некоторые изменения этих параметров могут происходить при изменении положения головы пациента. После определения производили вкол иглой с нитью в роговичный край лимба на меридиане проекции основания видимого в зоне зрачка гаптического элемента, прокалывали корень радужки, проводили иглу в заднюю камеру параллельно радужке в визуальную зону зрачка, затем этой же иглой прокалывали капсулу с обхватом задней поверхности основания видимого гаптического элемента в зрачковой зоне и проводили выкол иглы в переднюю камеру. Далее иглу проводили над радужной оболочкой в направлении угла передней камеры и выводили наружу, прокалывая роговицу в прелимбальной зоне по ходу движения иглы, нить отсекали над глазным яблоком. В 2–3 мм от места вкола иглы в зоне лимба формировали парацентез диаметром 1,0 мм и заполняли переднюю камеру вискоэластиком. В проекции парацентеза витреотомом 27G в корне радужки сформировали микроколобому (рис. 1А). Затем проводили микрокрючок через парацентез и микроколобому в заднюю камеру глаза и, продвигаясь параллельно радужке в зону зрачка, перемещались в переднюю камеру глаза, где захватывали выходной конец нити и обратным путем выводили ее через парацентез наружу (рис. 1Б). Затем микрокрючок заводили через тот же парацентез в переднюю камеру над корнем радужки у места вкола входного конца нити, захватывали второй конец нити и обратным путем выводили его наружу (рис. 1В).

Таким образом в образовавшейся петле оказывался захваченный гаптический элемент ИОЛ и фрагмент корня радужки шириной 2–3 мм. Далее за концы нити, выведенной в парацентез, захваченный гаптический элемент комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» подтягивали так, чтобы в зоне зрачка появилось основание противоположного гаптического элемента (рис. 1Г). В том случае, если предложенный прием не позволяет вывести противоположную гаптику из-под радужки в видимую зону зрачка, для ее визуализации можно использовать ирис-крючки или мидриатики.

На следующем этапе аналогичным образом производили манипуляции по подшиванию на противоположном гаптическом элементе ИОЛ, расположенном на противоположном конце меридиана (рис. 1Д). Место вкола иглы с нитью в роговицу и формирование микроколобомы осуществляли по соответствующим меридианам, симметрично в проекции ранее выполненных вколу и микроколобоме. После завершения манипуляций на противоположном гаптическом элементе линзы выведенные в парацентезы нити завязывали и отсекали (рис. 1Е). Вымывали вискоэластик из передней камеры, разрезы герметизировали методом гидратации.

Результаты контрольного осмотра через два года: средняя НКОЗ составила $0,86 \pm 0,23$, средняя МКОЗ — $0,96 \pm 0,13$, средний показатель ВГД — $17,6 \pm 1,63$ мм рт. ст.

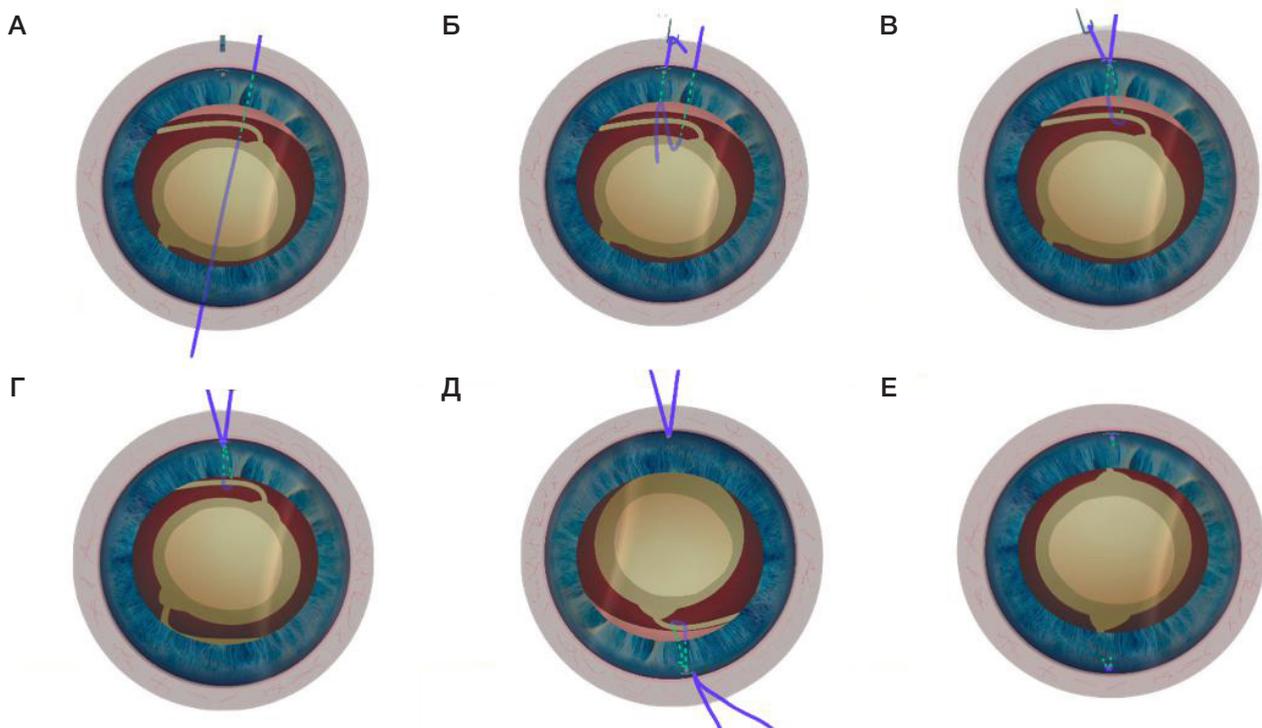


Рис. 1. Этапы репозиции ИОЛ в случаях дислокации комплекса «ИОЛ – капсульный мешок» с подшиванием к радужной оболочке (схема). **А.** Наложен шов на верхний гаптический элемент (синяя линия), игла с нитью проведена через роговичный край лимба, корень радужки (нахождение ее за радужкой и гаптическим элементом обозначено пунктирной линией) и выведена наружу по ходу иглы; выполнен парацентез в 2–3 мм от вкола иглы в лимб, в проекции парацентеза в корне радужки сформирована микроколобома (розовый цвет). **Б.** Выходной конец нити выведен микрокрючком через микроколобому и парацентез наружу. **В.** Входной второй конец нити выведен в тот же парацентез. **Г.** Подтянут комплекс «ИОЛ – капсульный мешок» до появления основания противоположного гаптического элемента. **Д.** Аналогичные манипуляции проведены на противоположном гаптическом элементе. **Е.** Выведенные нити завязаны и отсечены, разрезы гидратированы

Зрачки оперированных глаз круглые, реакция на свет живая, фиксирующие шовные узлы состоятельны, ИОЛ фиксированы и центрированы по предложенной технологии (рис. 2А, Б). При сравнении с парным глазом: зрачки одинаковых размеров и формы, прямая и содружественная реакции на свет сохранены в полном объеме.

Сравнительное пупиллографическое исследование проводили в различные сроки наблюдения после оперативного лечения на оперированном и неоперированном

парном глазу. Диаметр зрачка измеряли в скотопических (0,04 люкс), мезопических (4 люкс) и фотопических условиях (50 люкс). Результаты контрольного осмотра через два года: средний диаметр зрачка в скотопических условиях составил $4,45 \pm 0,71$ мм, в мезопических условиях — $4,27 \pm 0,68$ мм, в фотопических условиях — $3,97 \pm 0,59$ мм. Показатели пупиллографии парного (неоперированного) глаза: средний диаметр зрачка в скотопических условиях составил $4,3 \pm 0,83$ мм, в мезопических условиях — $4,07 \pm 0,76$ мм, в фотопических условиях — $3,81 \pm 0,76$ мм.

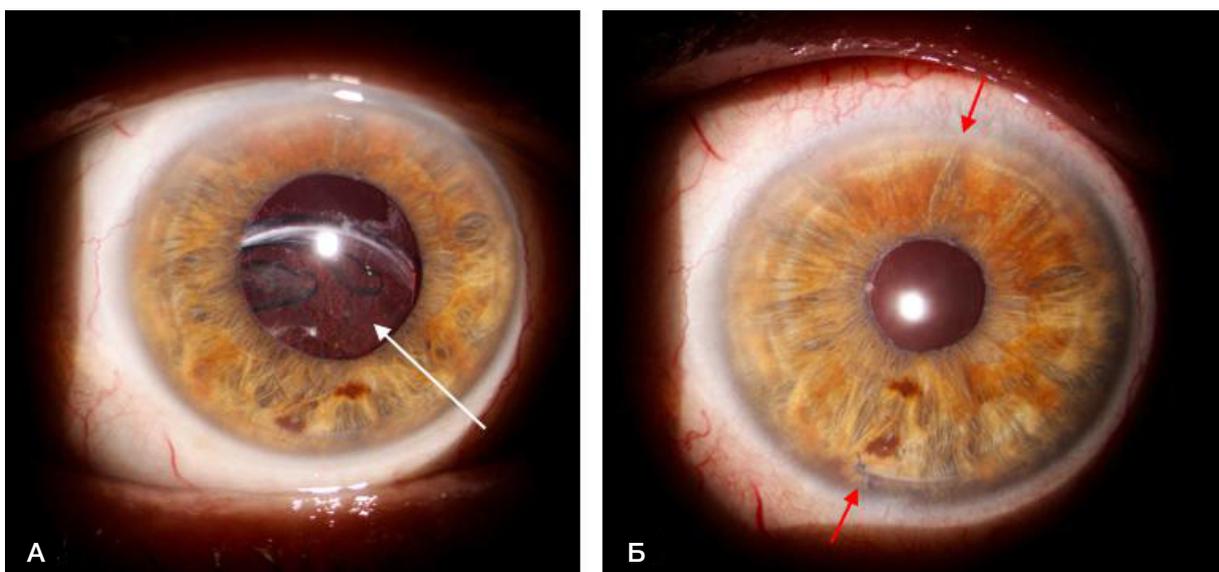


Рис. 2. Состояние переднего отрезка глаза пациента дислокацией комплекса «ИОЛ — капсульный мешок». **А.** До оперативного лечения (медикаментозный мидриаз): дислокация ИОЛ (белая стрелка). **Б.** После оперативного лечения: зрачок круглый, реакция на свет живая, фиксирующие шовные узлы состоятельны, ИОЛ фиксирована и центрирована по предложенной технологии; красными стрелками показаны зоны шовных узлов и микроколобом

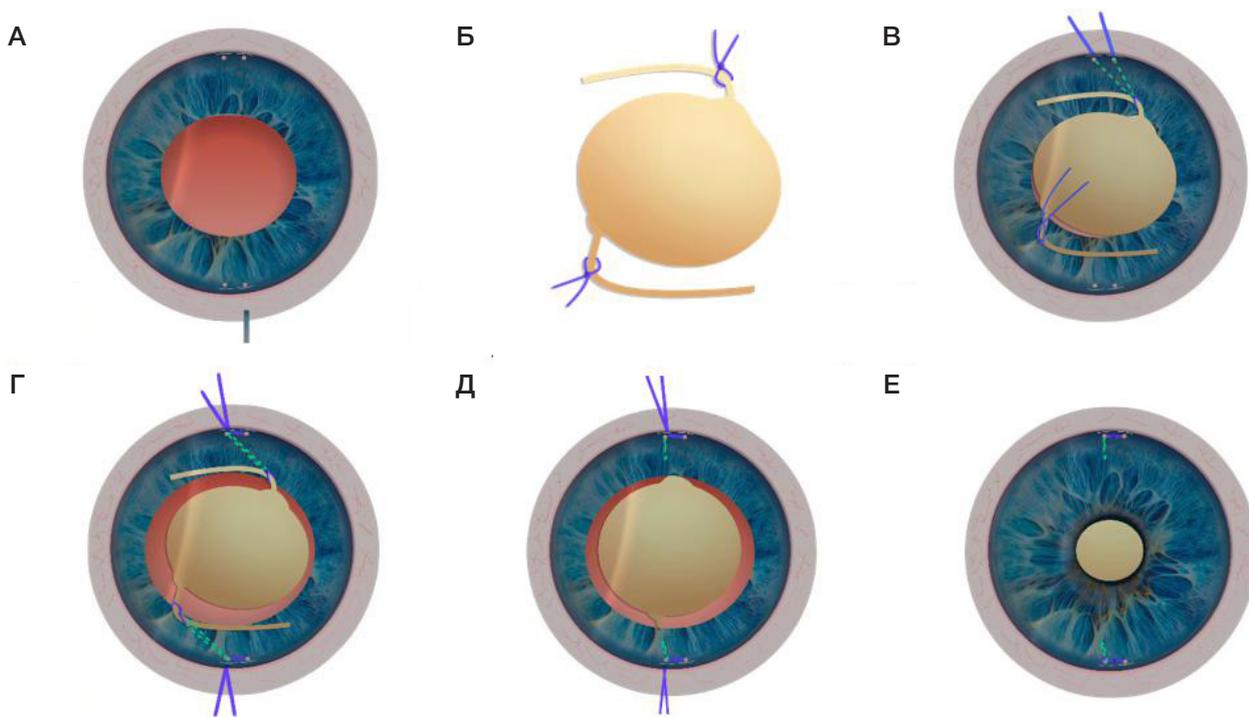


Рис. 3. Этапы имплантации ИОЛ при полном отсутствии «капсульной поддержки» (схема). А. В лимбе на расстоянии 2–3 мм друг от друга сформированы два парацентеза (темпоральный и назальный), симметрично на противоположных концах тех же меридианов выполнены аналогичные два парацентеза; далее в проекции каждого парацентеза сформированы микроколобомы (розовый цвет). Б. ИОЛ со швами имплантирована в переднюю камеру, микрокрючком концы фиксирующей нити верхнего гаптического элемента выведены в соответствующие микроколобому и парацентез (темпоральный и назальный). Г. Аналогичные манипуляции проведены на противоположном нижнем гаптическом элементе, микрокрючком оба конца соответствующих фиксирующих нитей выведены в верхний и нижний темпоральные парацентезы. Д. ИОЛ запровадена за радужку, концы фиксирующих нитей подтянуты и завязаны. Е. Концы нитей отсечены, вискоэластик вымыт, разрезы гидратированы

Обследование группы 2

Средняя НКОЗ составила $0,04 \pm 0,01$, средняя МКОЗ — $0,28 \pm 0,2$, средний показатель ВГД — $17,0 \pm 2,64$ мм рт. ст.

В двух случаях отмечалась постоперационная афакия с отсутствием капсульного мешка и разрушением передней гиалоидной мембраны, с частичной потерей передних отделов стекловидного тела, в одном случае афакия с отсутствием капсульного мешка, авитрией.

Для ситуации имплантации ИОЛ при полном отсутствии «капсульной поддержки» была выполнена разработанная нами технология (заявка на патент № 2024116758 от 18.06.2024 г.).

В зоне 12 ч на лимбе на расстоянии 2–3 мм параллельно друг другу, перпендикулярно лимбу выполняли два парацентеза (темпоральный и назальный). Симметрично в проекции данных меридианов в зоне 6 ч выполняли аналогичные два парацентеза. Переднюю камеру заполняли вискоэластиком. В проекции каждого парацентеза витреотомом 27 G в корне радужки зоны 12 и 6 ч формировали попарно темпоральную и назальную микроколобомы на расстоянии 2–3 мм друг от друга (рис. 3А). При необходимости для выполнения парацентезов и микроколобом можно выбирать локализацию в других зонах.

Вне глаза последовательно на верхний и нижний гаптические элементы ИОЛ завязывали по одной фиксирующей нити (рис. 3Б). После этого ИОЛ с завязанными фиксирующими нитями на верхнем и нижнем гаптических элементах запроваляли в иньектор и через предварительно выполненный роговичный тоннель имплантировали в переднюю камеру. Таким образом, ИОЛ располагалась в передней камере и была зафиксирована находящимися снаружи вне глаза концами завязанных на

гаптике нитей, проходящих через роговичный тоннель. Как вариант, концы нижней фиксирующей нити можно вывести микрокрючком в нижний парацентез, в результате ИОЛ будет подвешено за концы верхней фиксирующей нити в тоннеле и нижней — в одном из нижних парацентезов и линза может быть уже на этом этапе запровадена через зону зрачка за радужку.

Затем в зоне 12 ч последовательно заводили микрокрючок в темпоральный парацентез и микроколобому, продвигаясь в задней камере параллельно радужке, выходили через зрачок в переднюю камеру, где захватывали наружный конец фиксирующей нити верхнего гаптического элемента и выводили его обратным путем через парацентез наружу (рис. 3В). После этого аналогичным образом внутренний конец фиксирующей нити верхнего гаптического элемента выводили через назальную микроколобому и парацентез наружу. Затем микрокрючком через темпоральный парацентез заходили в угол передней камеры над назальной микроколобомой, захватывали второй внутренний конец фиксирующей нити и выводили его в один темпоральный парацентез. Аналогичные манипуляции с фиксирующей нитью нижнего гаптического элемента ИОЛ осуществляли на 6 ч (рис. 3Г).

После этих манипуляций ИОЛ запроваляли через зону зрачка за радужку, концы фиксирующих нитей верхнего и нижнего гаптических элементов подтягивали и завязывали узловыми швами (рис. 3Д). Оставшиеся концы отсекали в передней камере, вискоэластик вымывали, разрезы герметизировали методом гидратации (рис. 3Е).

Таким образом, ИОЛ постоянно удерживается внутри глаза фиксирующими нитями за гаптические элементы и не может самостоятельно переместиться за радужную оболочку и опуститься на глазное дно. Это позволяет

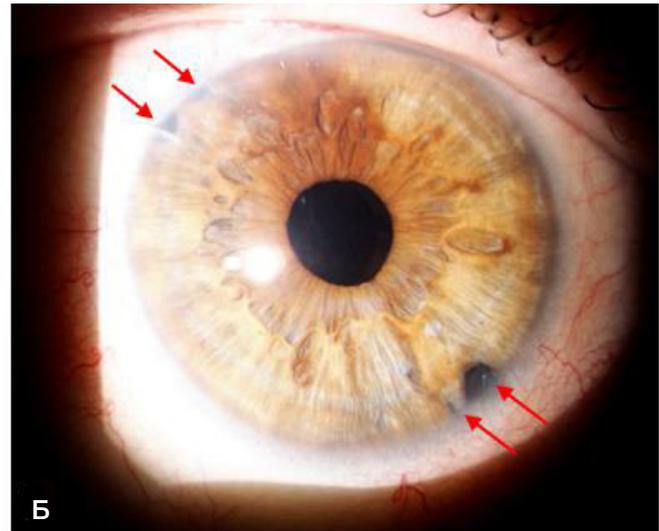
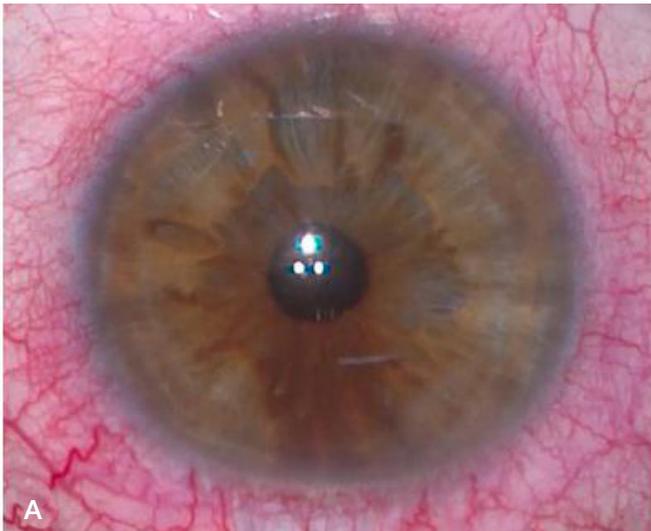


Рис. 4. Состояние переднего отрезка глаза пациента с отсутствием «капсульной поддержки». А. До оперативного лечения. **Б.** После оперативного лечения: зрачок круглый, реакция на свет живая, фиксирующие шовные узлы состоятельны, ИОЛ фиксирована и центрирована по предложенной технологии; красными стрелками показаны микроколобомы и зоны шовных узлов

офтальмохирургу при имплантации свободно и безопасно манипулировать ИОЛ внутри глаза, не опасаясь ее незапланированных перемещений.

Как вариант, в ситуации полной авитрии витреальную полость можно тампонировать перфторорганическим соединением (ПФОС) и выполнять все вышеперечисленные манипуляции в условиях тампонады и, соответственно, при завершении операции осуществляется замена ПФОС.

Результаты контрольного осмотра через год: средняя НКОЗ составила $0,53 \pm 0,15$, средняя МКОЗ — $0,66 \pm 0,05$, средний показатель ВГД — $18 \pm 4,9$ мм рт. ст.

Зрачки оперированных глаз круглые, реакция на свет живая, фиксирующие шовные узлы состоятельны, ИОЛ фиксированы и центрированы по предложенной технологии (рис. 4А, Б). При сравнении с парным глазом: зрачки одинаковых размеров и формы, прямая и содружественная реакции на свет сохранены в полном объеме.

По данным пупиллографии средний диаметр зрачка в скотопических условиях составил $4,39 \pm 1,02$ мм, в мезопических условиях — $3,98 \pm 0,97$ мм, в фотопических условиях — $3,53 \pm 1,04$ мм.

Показатели пупиллографии парного (неоперированного) глаза: средний диаметр зрачка в скотопических условиях составил $5,03 \pm 0,7$ мм, в мезопических условиях — $4,89 \pm 0,73$ мм, в фотопических условиях — $4,61 \pm 0,62$ мм.

Обследование группы 3

Средняя НКОЗ составила $0,35 \pm 0,27$, средняя МКОЗ — $0,51 \pm 0,43$, средний показатель ВГД — $13,6 \pm 1,52$ мм рт. ст. В двух случаях в верхних секторах отмечались разрушения связочного аппарата и капсулы хрусталика с повреждением передней гиалоидной мембраны и частичной потерей стекловидного тела; в одном случае полностью отсутствовала капсула хрусталика с сохраненной передней гиалоидной мембраной стекловидного тела.

Для ситуации имплантации ИОЛ при несостоятельности «капсульной поддержки» была выполнена разработанная нами технология (патент № RU 2809441, 11.12.2023. Приоритет 07.04.2023). По сути, это комбинация выше представленных второй и первой технологий.

В зоне 12 ч на лимбе на расстоянии 2–3 мм параллельно друг другу, перпендикулярно лимбу выполняли два

парацентеза: темпоральный и назальный (при этом зону выбора места выполнения парацентезов желательно, но не обязательно, проводить на меридиане, противоположном максимально сохранившимся остаткам «капсульной поддержки», которые можно использовать для дополнительной «поддержки» имплантируемой ИОЛ). Переднюю камеру заполняли висколастиком. В проекции каждого парацентеза витреотомом 27 G в корне радужки формировали темпоральную и назальную микроколобомы на расстоянии 2–3 мм друг от друга (рис. 5А). Вне глаза на верхний гаптический элемент ИОЛ завязывали фиксирующую нить (рис. 5Б). Линзу с завязанной фиксирующей нитью на верхнем гаптическом элементе заправляли в инжектор и через предварительно выполненный роговичный тоннель имплантировали в переднюю камеру. Таким образом, ИОЛ располагалась в передней камере и удерживалась в ней за концы завязанной за верхнюю гаптику нити, проходящей наружу через роговичный тоннель.

Затем последовательно заводили микрокрючок в темпоральный парацентез, микроколобому и, продвигаясь в задней камере параллельно радужке, выходили через зрачок в переднюю камеру, где захватывали наружный конец фиксирующей нити верхнего гаптического элемента и выводили его обратным путем наружу. После этого аналогичным образом внутренний конец фиксирующей нити верхнего гаптического элемента выводили через назальные микроколобому и парацентез наружу (рис. 5В). Верхний гаптический элемент заправляли за радужку и, подтягивая оба конца фиксирующей нити, заводили оптическую часть ИОЛ за плоскость радужки до появления основания нижнего гаптического элемента в области зрачка, при этом нижний гаптический элемент оставался в передней камере (рис. 5Г).

Следующим этапом производили манипуляции на нижнем гаптическом элементе, аналогичные описанной в первой технологии. Вкол иглы с нитью в роговицу и формирование микроколобомы осуществляли на противоположных концах, соответствующих меридиан, симметрично в проекции ранее выполненных верхних микроколобом.

Первым действием производили вкол иглой с нитью в роговичный край лимба, прокалывали корень радужки,

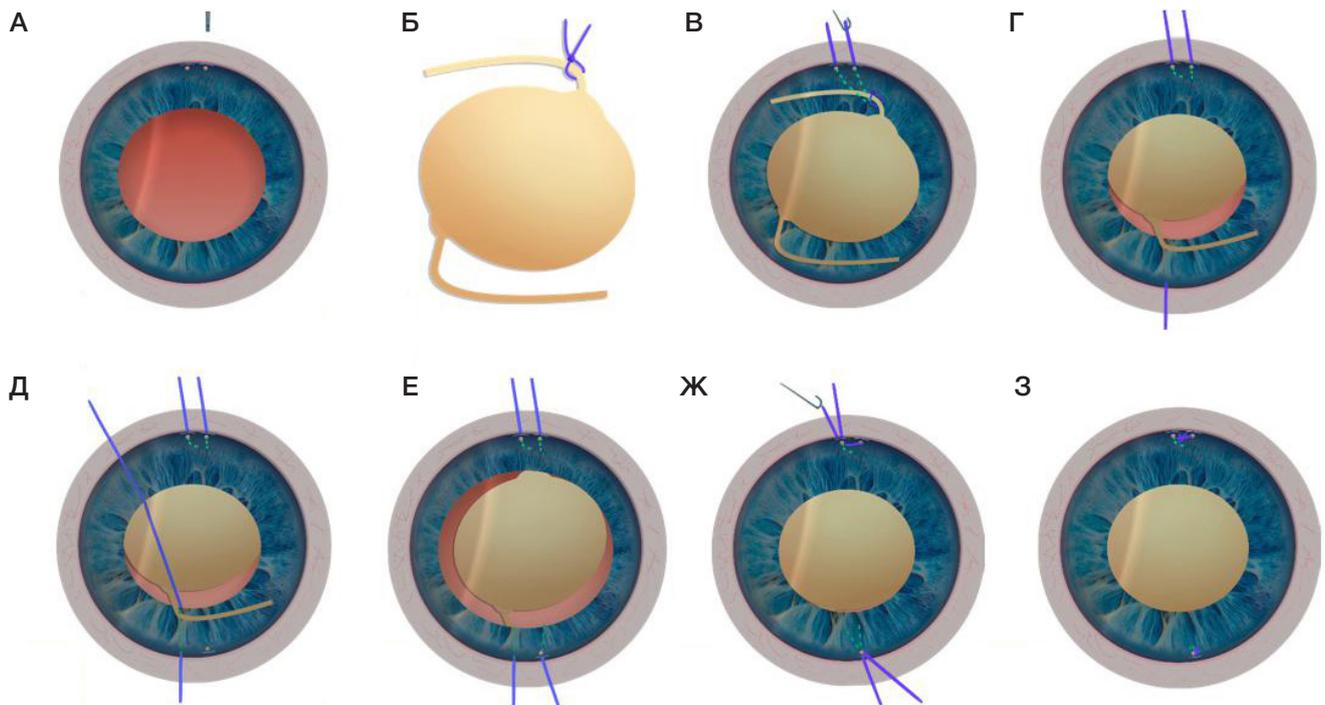


Рис. 5. Этапы имплантации ИОЛ и фиксации ее к радужной оболочке при несостоятельности «капсульной поддержки» (схема). А. В лимбе на расстоянии 2–3 мм друг от друга сформированы два парацентеза (темпоральный и назальный), далее в проекции каждого парацентеза сформированы микроколобомы (розовый цвет). Б. Вне глаза на верхний гаптический элемент завязывают фиксирующую нить (синий цвет). В. ИОЛ со швом имплантирована в переднюю камеру, микрокрючком выведены наружу через соответствующие микроколобому и парацентез внутренней и наружный концы фиксирующей нити верхнего гаптического элемента. Г. Верхний гаптический элемент заправлен за радужку; ИОЛ подтянута за концы нитей верх до появления основания нижнего гаптического элемента. Д. Наложен шов на нижний гаптический элемент (синяя линия), игла с нитью проведена через роговичный край лимба, корень радужки (нахождение ее за радужкой и гаптическим элементом обозначено пунктирной линией) и выведена наружу по ходу иглы; выполнен парацентез в 2–3 мм от вкола иглы в лимб, в проекции парацентеза в корне радужки сформирована микроколобома (розовый цвет). Е. Нижний гаптический элемент заправлен, выведен наружу микрокрючком через микроколобому и парацентез выходной конец нити. Ж. Выведены оба входных вторых конца нитей в парацентезы и завязаны. З. Концы нитей отсечены, вискоэластик вымыт, разрезы гидратированы

проводили иглу в задней камере параллельно радужке и выводили ее в зону зрачка, обхватывали заднюю поверхность основания видимого гаптического элемента в зрачковой зоне и выходили в переднюю камеру. Иглу проводили в передней камере над радужкой в направлении угла передней камеры и выводили наружу, прокалывая роговицу по ходу движения иглы, затем нить отсекали над глазным яблоком (рис. 5Д). Далее в 2–3 мм от вкола иглы в роговицу в зоне лимба выполняли парацентез, в его проекции витреотомом 27G формировали в корне радужки микроколобому, нижний гаптический элемент заправляли за радужку, затем микрокрючком через парацентез и микроколобому заходили за радужку в заднюю камеру и выходили параллельно радужке в зону зрачка в переднюю камеру и над телом ИОЛ захватывали выходной конец нити в передней камере, после чего обратным путем выводили ее через парацентез наружу. Затем микрокрючком через парацентез заходили в переднюю камеру, проходили над корнем радужки у места вкола входного конца нити, захватывали второй конец нити и обратным путем выводили его наружу (рис. 5Е). Таким образом в образовавшейся петле оказывается захваченным нижний гаптический элемент ИОЛ. После завершения работы на нижнем гаптическом элементе, оба конца фиксирующей нити верхнего гаптического элемента выводили в один парацентез (рис. 5Ж). Концы нитей завязывали и отсекали, вискоэластик вымывали из передней камеры, разрезы герметизировали методом гидратации (рис. 5З).

Результаты контрольного осмотра через 6 месяцев: средняя НКОЗ составила $0,8 \pm 0,17$, средняя МКОЗ — $0,9 \pm 0,17$, средний показатель ВГД — $13,3 \pm 2,5$ мм рт. ст.

Зрачки оперированных глаз круглые, реакция на свет живая, фиксирующие шовные узлы состоятельны,

ИОЛ фиксированы и центрированы по предложенной технологии. При сравнении с парным глазом: зрачки одинаковых размеров и формы, прямая и содружественная реакции на свет сохранены в полном объеме.

По данным пупиллографии средний диаметр зрачка в скотопических условиях составил $4,37 \pm 0,29$ мм, в мезопических условиях — $3,54 \pm 0,58$ мм, в фотопических условиях — $3,09 \pm 0,3$ мм.

Показатели пупиллографии парного (не оперированного) глаза: средний диаметр зрачка в скотопических условиях составил $4,53 \pm 0,44$ мм, в мезопических условиях — $3,95 \pm 0,61$ мм, в фотопических условиях — $3,45 \pm 0,39$ мм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема послеоперационной дислокации комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» в офтальмохирургии остается актуальной. Анализ литературных данных показывает, что к настоящему времени эффективных методов решения проблемы послеоперационного смещения комплекса пока нет. Общепризнанны два типа коррекции данного осложнения: подшивание дислоцированной ИОЛ к оболочкам глазного яблока (радужке или склере) либо замена ее на ИОЛ другого типа фиксации, каждый из которых имеет ряд существенных недостатков [33]. Шовная фиксация к радужной оболочке обладает наименьшим риском осложнений во время и послеоперационном периоде, риском повторных дислокаций, а также обеспечивает более стабильное и центральное положение ИОЛ по отношению к оптической оси глаза.

Рядом авторов предложены различные оригинальные методы репозиции и подшивания комплекса «ИОЛ —

капсульный мешок» к радужной оболочке [1, 17, 21, 28, 34, 35]. К недостаткам предложенных технологий относятся: отсутствие визуализации при манипуляциях на гаптических элементах; наложение фиксирующих швов в наиболее подвижных участках стромы радужной оболочки, которые приводят к нарушению диафрагмальной функции радужки, а также к косметическим дефектам различной степени выраженности, связанных с формой, размером и синхронностью работы зрачков. Кроме того, зона наложения швов в этих случаях находится под постоянным напряжением мышц антагонистов (сфинктера и дилатора зрачка), что создает неблагоприятные условия для сохранения прочности, надежности и долговременности фиксирующих узловых швов в отдаленном послеоперационном периоде. При таких способах подшивания значительно затруднено получение топографически точного и симметричного наложения фиксирующих швов на противоположные гаптические элементы ИОЛ с одинаковым дозированным захватом объема ткани радужки.

Разработанная и предложенная в данной работе технология микрохирургического подшивания к радужке комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» имеет ряд существенных преимуществ перед используемыми методиками. Прежде всего, все манипуляции, связанные с захватом и прошиванием гаптических элементов ИОЛ, осуществляют под полным визуальным микроскопическим контролем в зоне зрачка или передней камеры, обеспечивая точное и атравматичное микрохирургическое выполнение работы. Использование микроколомом корня радужки в проекции лимба на противоположных концах одного и того же меридиана обеспечивает топографически точное и симметричное наложение фиксирующих швов на противоположные гаптические элементы ИОЛ с размещением в фиксирующем шовном узле гаптического элемента ИОЛ и одинакового дозированного объема ткани корня радужки (2–3 мм) запланированной локализации. Это обеспечивает высококачественную центрацию ИОЛ, в том числе при торических и мультифокальных моделях.

Расположение фиксирующих шовных узлов в проекции лимба, в зоне максимально инертной в функциональном отношении ткани корня радужки при ограниченном ее захвате в объеме 2–3 мм, практически не изменяет строение и структуру радужной оболочки и не нарушает работу ее мышечного аппарата, что обеспечивает полное сохранение объема функций и косметических свойств радужки и зрачка. Минимальное динамическое напряжение, испытываемое функционально инертными тканями корня радужки, также обеспечивает надежность, прочность и долговременность фиксирующих свойств шовного узла.

Положительную особенность данной технологии придает также более доступная возможность повторных и дополнительных манипуляций для достижения поставленных целей.

При удалении катаракты офтальмохирурги периодически встречаются с проблемами несостоятельности или отсутствия «капсульной поддержки». Наиболее частая причина несостоятельности связана со слабостью связочного аппарата хрусталика. В этих случаях принимают наиболее популярное решение этой проблемы — имплантацию капсульного кольца, позволяющую в ходе операции стабилизировать капсульный мешок и выполнить имплантацию ИОЛ. Однако часть авторов отмечают невысокую эффективность данной методики [33, 36].

Нередко у пациентов из этой группы в послеоперационном периоде возникает дислокация комплекса «ИОЛ — капсульный мешок». Помимо проблем со связочным аппаратом, у некоторых пациентов по ходу операции возникает разной степени проблемы с целостностью капсулы хрусталика, вплоть до ее полного разрушения и удаления. Отдельную группу пациентов с проблемной «капсульной поддержкой» составляют пациенты с афакиями различного генеза (послеоперационные, травматические и т. д.). Для большинства из них возникает потребность в дополнительной фиксации ИОЛ в ходе первичных и отсроченных хирургических вмешательств [37].

Еще в 1950–1960-х гг. возник интерес к бесшовной фиксации ИОЛ к радужке, когда два офтальмолога предложили схожие по типу фиксации модели ИОЛ: E. Epstein — ИОЛ в виде «мальтийского креста», или «запонки», C. D. Binkhorst — ирис-клипс-линзу [31, 38, 39].

Позднее в 1968 г. С. Н. Фёдоровым и В. Д. Захаровым была создана ирис-клипс-линза «Спутник», которая в течение ряда лет служила базовой моделью в клинической практике офтальмохирургов. Однако для этого типа фиксации было характерно такое тяжелейшее осложнение, как дислокация ИОЛ в переднюю камеру или в витреальную полость при любом запланированном или незапланированном расширении зрачка, а также невозможность полноценного осуществления диафрагмальной функции радужки [8, 40].

В 1970 г. J. Worst предложил модель ИОЛ под названием «медальон», которую надо было подшивать к радужке за экваториальную зону линзы, а в 1973 г. разработал модель линзы с бесшовным креплением к радужке, получившей название «линза-коготь». Данный способ крепления заключался в ущемлении стромы радужки в двух точках на дистальных концах ИОЛ, для чего в гаптической части линзы были выполнены щелевидные прорези. Ключевые моменты операции — использование миотиков для максимального сужения зрачка и расправления радужки, использование вискоэластиков для минимизации травмирования эндотелия роговицы, использование второго инструмента для удержания ИОЛ во время фиксирования [8, 41]. Однако крепление ИОЛ к функционально активной зоне стромы радужки нарушало ее функциональные свойства.

Большинство работ, посвященных технике подшивания ИОЛ к радужке, описывают процесс шовного фиксирования гаптических элементов линзы к средне-периферической зоне стромы радужной оболочки с использованием способа M. A. McCannel с узлами Sierpser или узлов типа «мертвой петли». Среди недостатков предложенного метода фиксации линзы — нарушения функции радужки, а также высокий риск развития атрофии радужки, пигментной дисперсии, увеита и кистозного макулярного отека [8, 42].

Некоторыми авторами были продемонстрированы различные способы подшивания ИОЛ к радужной оболочке в случаях отсутствия или несостоятельности капсульной поддержки, которые способны обеспечить фиксацию линзы [40, 43, 44]. Основным недостатком предложенных технологий оставался риск незапланированной люксации ИОЛ в витреальную полость во время операции, со всеми вытекающими из этого последствиями и осложнениями. Технические недостатки предложенных методов: наложение швов в функционально активных зонах стромы радужки, что приводит к деформации зрачка (нарушение диафрагмальной и косметической функций); отсутствие

полного визуального контроля за манипуляциями захвата и подшивания гаптических элементов ИОЛ по ходу операции; сложности получения топографически выдержанных и симметрично наложенных фиксирующих швов на противоположных гаптических элементах; повышенный риск непрогнозируемого травматизма структур переднего сегмента глаза в условиях предельной ограниченности маневренности офтальмохирурга.

Разработанная и предложенная в данной работе технология имплантации ИОЛ при полном отсутствии «капсульной поддержки» имеет ряд существенных преимуществ перед используемыми методиками.

Помимо вышеописанных (в первой технологии) достоинств, также используемых здесь при аналогичных микрохирургических приемах и манипуляциях, наложение фиксирующих нитей на оба гаптических элемента ИОЛ вне глаза с последующей имплантацией обеспечивает на протяжении всей операции полностью контролируемое положение ИОЛ, которое зафиксировано нитями, выведенными наружу. Предлагаемая технология решает ключевую проблему — при проведении операции в этих сложных условиях обеспечивает на протяжении всей операции полностью контролируемое поведение ИОЛ внутри глаза и позволяет исключить риски люксации линзы на глазное дно. В этой ситуации офтальмохирург чувствует уверенность и полностью управляет технологическим процессом, а также не испытывает ограничений при необходимости выполнения дополнительных реконструктивных манипуляций в глазу. Осуществление основной части манипуляций в передней камере обеспечивает полный визуальный контроль за работой со швами и надежное выведение концов нитей в запланированные зоны формирования фиксирующих шовных узлов.

Использование микроколобом и микрокрючков для захвата и выведения концов фиксирующих нитей делает процесс полностью управляемым, предсказуемым, атравматичным, обеспечивая точную по локализации и захвату зону необходимого объема (2–3 мм) ткани корня радужки для фиксации в шовных узлах. Симметричное точное топографическое расположение фиксирующих шовных узлов в проекции лимба на противоположных концах одного и того же меридиана обеспечивает запланированную высококачественную фиксацию и центрацию ИОЛ. При этом обеспечивается сохранность полного объема функций радужки и ее анатомо-косметических свойств.

Разработанная и предложенная в данной работе технология при несостоятельности «капсульной поддержки» (неполного разрушения целостности связочного аппарата и/или капсульного мешка хрусталика) — по сути комбинация первых двух технологий, когда первым этапом на одном гаптическом элементе выполняется набор манипуляций из второй технологии со всеми присущими ей преимуществами, а вторым этапом на противоположном гаптическом элементе набор манипуляций из первой технологии со всеми ее преимуществами. Предпочтение этой технологии отдается в ситуациях, когда сохраняются остатки «капсульной поддержки», которые можно использовать для дополнительной «поддержки» ИОЛ во время имплантации. Наличие такой технологии в арсенале дает возможность в сомнительных ситуациях для офтальмохирурга подстраховываться в тех случаях, когда имеется риск «упустить» ИОЛ по ходу операции в витреальную полость. Наложение фиксационного шва вне

глаза на один из гаптических элементов с последующим выведением его концов в парацентезы обеспечивает на протяжении всей операции контролируемое поведение ИОЛ внутри глаза и не позволяет линзе люксоваться на глазное дно.

При этих технологиях весь набор манипуляций, который осуществляется через самогерметизирующиеся микропроколы и микроразрезы с использованием вискоэластиков, создает условия для анатомо-топографической стабильности структур и микропространств глаза во время операции, обеспечивая таким образом микрохирургическому процессу возможность более точного, управляемого, атравматичного микроконструирования внутри глаза.

Таким образом, разработанный и предложенный набор микроконструктивных технологий позволяет эффективно использовать подшивание ИОЛ к радужной оболочке, при этом обеспечивая полное сохранение ее функций, в условиях различных ситуаций несостоятельности или отсутствия возможности фиксации и центрации линзы за счет «капсульной поддержки».

ВЫВОДЫ

Разработанные и предложенные микроконструктивные технологии позволяют следующее. 1. Перенести проведение основных манипуляций по захвату швом гаптических элементов ИОЛ в видимую (визуальную) зону зрачка и передней камеры, которая обеспечивает высокий технологический уровень проведения операций под полным микроскопическим контролем, что значительно улучшает точность, управляемость, безопасность и атравматичность процесса. 2. Выполнять микроколобомы в корне радужки в проекции лимбальных парацентезов и проводить через них при помощи микрокрючка конец нити захватывающий гаптический элемент; таким образом в образующуюся петлю фиксирующего узла надежно захватывается гаптический элемент ИОЛ и дозированный объем (2–3 мм) ткани корня радужки запланированной локализации. Точное топографическое исполнение этой манипуляции позволяет получить на одном меридиане симметричное расположение фиксирующих узлов на противоположных гаптических элементах ИОЛ, обеспечивающее высококачественную центрацию, в том числе при торических и мультифокальных моделях. 3. Наложить в проекции лимба топографически ориентированные, дозированные, фиксирующие шовные узлы, локализованные в зоне максимально инертной, в функциональном отношении ткани корня радужки и в результате этого обеспечить полноценное сохранение объема функций и косметических свойств радужки и зрачка. Кроме того, минимальное динамическое напряжение, испытываемое тканями корня радужки, обеспечивает надежность, прочность и долговременность фиксирующих свойств шовного узла. 4. Наложить фиксирующие нити на гаптические элементы ИОЛ вне глаза с последующей имплантацией, при несостоятельности или отсутствии «капсульной поддержки», которые обеспечивают на протяжении всей операции полностью контролируемое поведение ИОЛ внутри глаза, позволяющее исключить риски люксации линзы в витреальную полость, что придает максимальную уверенность офтальмохирургу и возможность полностью управлять интраоперационным технологическим процессом. 5. Выполнять весь набор манипуляций через самогерметизирующиеся микропроколы и микроразрезы,

с использованием вискоэластиков, создающих условия для анатомо-топографической стабильности структур и микропространств внутри глаза на протяжении всей операции и обеспечивать проведение микрохирургической реконструкции на более высоком уровне. Это открывает

новое направление в офтальмохирургии — возможность собирать разборные конструкции внутри глаза из различных микродеталей (микроконструирование) и, прежде всего, сборку и монтаж ИОЛ из отдельных микроэлементов.

Литература

- Смирнов А. К., Соколов К. В. Сравнительный анализ методов подшивания дислоцированных комплексов «интраокулярная линза–капсульный мешок» в различных клинических ситуациях. Тихоокеанский медицинский журнал. 2019; 2: 70–73.
- Аветисов С. Э., Липатов Д. В., Федоров А. А. Морфологические изменения при несостоятельности связочно-капсулярного аппарата хрусталика. Вестник офтальмологии. 2002; 118 (4): 22–23.
- Briszi A, Prahs P, Hillenkamp J, Helbig H, Herrmann W. Complication rate and risk factors for intraoperative complications in resident-performed phacoemulsification surgery. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250: 1315–20.
- Hennig A, Johnson GJ, Evans JR, Lagnado R, Poulson A, Pradhan D, et al. Long-term clinical outcome of a randomised controlled trial of anterior chamber lenses after high volume intracapsular cataract surgery. Br J Ophthalmol. 2001; 85: 11–17.
- Konradsen TR, Zetterström C. A descriptive study of ocular characteristics in Marfan syndrome. Acta Ophthalmol. 2013; 91 (8): 751–5.
- Jacqueline N. Review of surgical techniques for posterior chamber intraocular lens fixation in the absence of capsular lens support. US Ophthalmic Review. 2015; 8 (2): 86–91.
- Ma X, Li Z. Capsular tension ring implantation after lens extraction for management of subluxated cataracts. Int J Clin Exp Pathol. 2014; 7 (7): 3733–8.
- Кадатская Н. В. Микрохирургические технологии шовной фиксации ИОЛ в хирургии катаракты, осложненной слабостью или полным отсутствием капсульной поддержки [диссертация]. М., 2017.
- Dureau P. Pathophysiology of zonular diseases. Curr Opin Ophthalmol. 2008; 19: 27–30.
- Hoffman RS, Snyder ME, Devgan U, Allen QB, Yeoh R, Braga-Mele R. Management of the subluxated crystalline lens. Journal of Cataract & Refractive Surgery. 2013; 39 (12): 1904–15.
- Kohnen T. Pseudoexfoliation: impact on cataract surgery and long-term intraocular lens position. J Cataract Refract Surg. 2010; 36 (8): 1247–8.
- Паштаев Н. П. Классификация дислокаций хрусталика, современная тактика лечения. В кн.: С. Н. Федоров, редактор. Актуальные проблемы хирургии хрусталика, стекловидного тела и сетчатки: Сб. науч. тр. Моск. НИИ микрохирургии глаза. М., 1986; с. 34–37.
- Паштаев Н. П. Хирургия подвывихнутого и вывихнутого в стекловидное тело хрусталика. Чебоксары: ГОУ ИУВ, 2006.
- Белоноженко Я. В., Сорокин Е. Л. Возможности профилактики дислокации комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» у больных с легкой степенью подвывиха хрусталика при выполнении факосмульсификации возрастной катаракты. Офтальмологические ведомости. 2012; 5 (3): 42–47.
- Белоноженко Я. В., Сорокин Е. Л. Вариант выбора способа хирургической коррекции афакии при выполнении факосмульсификации возрастной катаракты с легкой степенью подвывиха хрусталика. Практическая медицина. 2012; 4 (59): 263–6.
- Мамедов Ш. Ю., Агаев М. М., Султанова М. М. Сравнительная оценка течения послеоперационного периода при проведении факосмульсификации у пациентов с осложненной катарактой. Oftalmologiya. 2014; 1 (14): 81–83.
- Розанова О. И. Отдаленные результаты фиксации заднекамерной ИОЛ к радужке «обратным ходом» при зонулярных дефектах. Современные технологии в офтальмологии. 2018; 5: 123–5.
- Davis D, Brubaker J, Espandar L, Stringham J, Crandall A, Werner L et al. Late in-the-bag spontaneous intraocular lens dislocation: evaluation of 86 consecutive cases. Ophthalmology. 2009; 116 (4): 664–70.
- Krepste L, Kuzmiene L, Miliauskas A, Januleviciene I. Possible predisposing factors for late intraocular lens dislocation after routine cataract surgery. Medicina. 2013; 49 (5): 229–34.
- Терещенко Ю. А., Кривко С. В., Сорокин Е. Л., Егоров В. В. Спонтанная дислокация заднекамерных интраокулярных линз в позднем послеоперационном периоде: частота, причины, осложнения. РМЖ. Клиническая офтальмология. 2010; 11 (3): 100–2.
- Иванов Д. И., Никитин В. Н. Хирургическое лечение пациентов с дислокацией комплексов ИОЛ-фиброзированный капсульный мешок. Офтальмология. 2022; 19 (2): 307–17.
- Потемкин В. В., Астахов С. Ю., Гольцман Е. В., Ван С. Ю. Оценка факторов риска развития поздней дислокации интраокулярной линзы. Офтальмология. 2021; 18 (1): 103–10.
- Gross JG, Kokame GT, Weinberg DV. In-the-bag intraocular lens dislocation. Am J Ophthalmol. 2004; 137 (4): 630–5.
- Ganesh SK, Sen P, Sharma HR. Late dislocation of in-the-bag intraocular lenses in uveitic eyes: An analysis of management and complications. Indian J Ophthalmol. 2017; 65 (2): 148–54.
- Liu E, Cole S, Werner L, Hengerer F. Pathologic evidence of pseudoexfoliation in cases of in-the-bag intraocular lens subluxation or dislocation. Journal of Cataract and Refractive Surgery. 2015; 41 (5): 929–35.
- Терещенко Ю. А., Кривко С. В., Сорокин Е. Л., Егоров В. В. Выяснение причин дислокации комплекса «ИОЛ — капсульный мешок» в позднем послеоперационном периоде хирургии катаракты. Современные технологии катарактальной и рефракционной хирургии. Сборник научных работ. М., 2010; с. 92–195.
- Иванова Н. В., Расин О. Г., Савченко А. В., Литвиненко О. А. Концепция стабильной фиксации ИОЛ при авитрии и несостоятельности связочного аппарата хрусталика. Современные технологии в офтальмологии. 2019; 1: 66–70.
- Dajee KP, Abbey AM, Williams GA. Management of dislocated intraocular lenses in eyes with insufficient capsular support. Current Opinion in Ophthalmology. 2016; 27 (3): 191–5.
- Donaldson KE, Gorscak JJ, Budenz DL. Anterior chamber and sutured posterior chamber intraocular lenses in eyes with poor capsular support. American Journal of Ophthalmology. 2005; 140 (5): 903–9.
- Faria MY, Ferreira NP, Canastro M. Management of Dislocated Intraocular Lenses with Iris Suture. European Journal of Ophthalmology. 2017; 27 (1): 45–48.
- Потемкин В. В., Гольцман Е. В. Способы хирургической коррекции дислокаций интраокулярных линз и афакии (обзор литературы). Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. 2019; 26 (1): 20–28.
- Nottage JM, Bhasin V, Nirankari VS. Long-term safety and visual outcomes of transscleral sutured posterior chamber IOLs and penetrating keratoplasty combined with transscleral sutured posterior chamber IOLs. Trans Am Ophthalmol Soc. 2009; 107: 242–50.
- Егорова А. В., Васильев А. В., Смолякова Г. П. Результаты хирургического лечения дислокации интраокулярных линз. Офтальмохирургия. 2017; 1: 6–9.
- Сороколетов Г. В., Дибина Д. А., Арисов А. А., Молова З. А.,

- авторы; ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России», патентообладатель. Способ репозиции и подшивания дислоцированной интраокулярной линзы к радужной оболочке. Патент РФ № 2765539. 31.01.2022.
35. Тепловодская В. В., Дибина Д. А., Судакова Е. П., Носиров П. О., авторы; ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава России», патентообладатель. Способ репозиции и фланцевой фиксации дислоцированной интраокулярной линзы вместе с капсульным мешком к радужной оболочке (варианты). Патент РФ № 2773103. 30.05.2022.
 36. Иошин И. Э., Егорова Э. В. Внутрикапсульное кольцо — профилактика осложнений экстракции катаракты при подвывихе хрусталика. Офтальмохирургия. 2002; 1: 25–28.
 37. Щуко А. Г., Мищенко О. П., Сенченко Н. Я., Юрьева Т. Н. Факторы риска и осложнения, возникающие при поздних спонтанных дислокациях комплекса «заднекамерная ИОЛ – капсульный мешок» в стекловидное тело. Офтальмохирургия. 2017; 1: 21–26.
 38. Binkhorst CD. Artificial pseudophakia. Long-term results obtained with the papillary lens (iris-clip lens) in the first twenty cases of unilateral aphakia. Br J Ophthalmol. 1962; 46: 947–56.
 39. Epstein E. Modified Ridley lenses. Johannesburg, South Africa. Br J Ophthalmol. 1959; 43: 29–33.
 40. Марухненко А. М., Кадатская Н. В. ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова Минздрава России», патентообладатель. Способ шовной фиксации к радужке интраокулярной линзы при ее люкасации в стекловидное тело. Патент РФ №2619748. 17.05.2017.
 41. Worst JGF. Extracapsular surgery in lens implantation (Birkhorst lection). Amer Intraocular Implant Soc J. 1977; 13 (2): 102–04.
 42. Chang DF. Siepser slipknot for McCannel iris-suture fixation of subluxated intraocular lenses. Journal of Cataract and Refractive Surgery. 2004; 30: 1170–6.
 43. Марухненко А. М., патентообладатель. Способ фиксации мягких интраокулярных линз. Патент РФ № 2141295. 20.11.1999.
 44. Фечин О. Б., авторы; Акционерное общество «Екатеринбургский центр МНТК "Микрохирургия глаза"», патентообладатель. Способ имплантации и шовной фиксации S-образной интраокулярной линзы к радужке. Патент РФ №2017133687. 28.08.2018.

References

1. Smirnov AK, Sokolov KV. Sravnitel'nyj analiz metodov podshivanja dislocirovannykh kompleksov «intraokuljarnaja linza–kapsul'nyj meshok» v razlichnykh klinicheskikh situacijah. Tihoookeanskij medicinskij zhurnal. 2019; 2: 70–73. Russian.
2. Avetisov SYe, Lipatov DV, Fedorov AA. Morfologicheskije izmenenija pri nesostojatel'nosti svjazochno-kapsuljarnogo apparata hrustalika. Vestnik oftal'mologii. 2002; 118 (4): 22–23. Russian.
3. Briszi A, Prahns P, Hillenkamp J, Helbig H, Herrmann W. Complication rate and risk factors for intraoperative complications in resident-performed phacoemulsification surgery. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2012; 250: 1315–20.
4. Hennig A, Johnson GJ, Evans JR, Lagnado R, Poulson A, Pradhan D, et al. Long-term clinical outcome of a randomised controlled trial of anterior chamber lenses after high volume intracapsular cataract surgery. Br J Ophthalmol. 2001; 85: 11–17.
5. Konradsen TR, Zetterström C. A descriptive study of ocular characteristics in Marfan syndrome. Acta Ophthalmol. 2013; 91 (8): 751–5.
6. Jacqueline N. Review of surgical techniques for posterior chamber intraocular lens fixation in the absence of capsular lens support. US Ophthalmic Review. 2015; 8 (2): 86–91.
7. Ma X, Li Z. Capsular tension ring implantation after lens extraction for management of subluxated cataracts. Int J Clin Exp Pathol. 2014; 7 (7): 3733–8.
8. Kadatskaja NV. Mikrohirurgicheskie tehnologii shovnoj fiksacii IOL v hirurgii katarakty, oslozhnennoj slabost'ju ili polnym otsutstviem kapsul'noj podderzhki [dissertacija]. M., 2017. Russian.
9. Dureau P. Pathophysiology of zonular diseases. Curr Opin Ophthalmol. 2008; 19: 27–30.
10. Hoffman RS, Snyder ME, Devgan U, Allen QB, Yeoh R, Braga-Mele R. Management of the subluxated crystalline lens. Journal of Cataract & Refractive Surgery. 2013; 39 (12): 1904–15.
11. Kohnen T. Pseudoexfoliation: impact on cataract surgery and long-term intraocular lensposition. J Cataract Refract Surg. 2010; 36 (8): 1247–8.
12. Pashtaev NP. Klassifikacija dislokacij hrustalika, sovremennaja taktika lechenija. V kn.: S. N. Fedorov, redaktor. Aktual'nye problemy hirurgii hrustalika, steklovidnogo tela i setchatki: Sb. nauch. tr. Mosk. NII mikrohirurgii glaza. M., 1986; s. 34–37. Russian.
13. Pashtaev NP. Hirurgija podvyihnutogo i vyvihnutogo v steklovidnoe telo hrustalika. Cheboksary: GOU IUV, 2006. Russian.
14. Belonozhenko YaV, Sorokin EL. Vozможности profilaktiki dislokacii kompleksa «IOL — kapsul'nyj meshok» u bol'nyh s legkoj stepen'ju podvyihva hrustalika pri vypolnenii fakojezul'sifikacii vozrastnoj katarakty. Oftal'mologicheskie vedomosti. 2012; 5 (3): 42–47. Russian.
15. Belonozhenko YaV, Sorokin EL. Variant vybora sposoba hirurgicheskoi korekcii afakii pri vypolnenii fakojezul'sifikacii vozrastnoj katarakty s legkoj stepen'ju podvyihva hrustalika. Prakticheskaja medicina. 2012; 4 (59): 263–6. Russian.
16. Mamedov ShYu, Agaev MM, Sultanova MM. Sravnitel'naja ocenka techenija posleoperacionnogo perioda pri provedenii fakojezul'sifikacii u pacientov s oslozhnennoj kataraktoj. Oftalmologiya. 2014; 1 (14): 81–83. Russian.
17. Rozanova OI. Otdalennye rezul'taty fiksacii zadnekamernoj IOL k raduzhke «obratnym hodom» pri zonuljarnyh defektah. Sovremennye tehnologii v oftal'mologii. 2018; 5: 123–5. Russian.
18. Davis D, Brubaker J, Espandar L, Stringham J, Crandall A, Werner L et al. Late in-the-bag spontaneous intraocular lens dislocation: evaluation of 86 consecutive cases. Ophthalmology. 2009; 116 (4): 664–70.
19. Krepste L, Kuzmiene L, Miliauskas A, Januleviciene I. Possible predisposing factors for late intraocular lens dislocation after routine cataract surgery. Medicina. 2013; 49 (5): 229–34.
20. Tereshhenko YuA, Krivko SV, Sorokin EL, Egorov VV. Spontannaja dislokacija zadnekamernyh intraokuljarnyh linz v pozdnem posleoperacionnom periode: chastota, prichiny, oslozhnenija. RMZh. Klinicheskaja oftal'mologija. 2010; 11 (3): 100–2. Russian.
21. Ivanov DI, Nikitin VN. Hirurgicheskoe lechenie pacientov s dislokaciej kompleksov IOL-fibrozirovannyj kapsul'nyj meshok. Oftal'mologija. 2022; 19 (2): 307–17. Russian.
22. Potemkin VV, Astahov SYu, Golcman EV, Van SYu. Ocenka faktorov riska razvitiya pozdnej dislokacii intraokuljarnoj linzy. Oftal'mologija. 2021; 18 (1): 103–10. Russian.
23. Gross JG, Kokame GT, Weinberg DV. In-the-bag intraocular lens dislocation. Am J Ophthalmol. 2004; 137 (4): 630–5.
24. Ganesh SK, Sen P, Sharma HR. Late dislocation of in-the-bag intraocular lenses in uveitic eyes: An analysis of management and complications. Indian J Ophthalmol. 2017; 65 (2): 148–54.
25. Liu E, Cole S, Werner L, Hengerer F. Pathologic evidence of pseudoexfoliation in cases of in-the-bag intraocular lens subluxation or dislocation. Journal of Cataract and Refractive Surgery. 2015; 41 (5): 929–35.
26. Tereshhenko YuA, Krivko SV, Sorokin EL, Egorov VV. Vyjasnenie prichin dislokacii kompleksa «IOL — kapsul'nyj meshok» v pozdnem posleoperacionnom periode hirurgii katarakty. Sovremennye tehnologii kataraktal'noj i refrakcionnoj hirurgii. Sbornik nauchnyh rabot. M., 2010; s. 92–195. Russian.
27. Ivanova NV, Rasin OG, Savchenko AV, Litvinenko OA. Konceptcija stabil'noj fiksacii IOL pri avirii i nesostojatel'nosti svjazochnogo apparata hrustalika. Sovremennye tehnologii v oftal'mologii. 2019; 1: 66–70. Russian.
28. Dajee KP, Abbey AM, Williams GA. Management of dislocated intraocular lenses in eyes with insufficient capsular support. Current Opinion in Ophthalmology. 2016; 27 (3): 191–5.

29. Donaldson KE, Gorscak JJ, Budenz DL. Anterior chamber and sutured posterior chamber intraocular lenses in eyes with poor capsular support. *American Journal of Ophthalmology*. 2005; 140 (5): 903–9.
30. Faria MY, Ferreira NP, Canastro M. Management of Dislocated Intraocular Lenses with Iris Suture. *European Journal of Ophthalmology*. 2017; 27 (1): 45–48.
31. Potemkin VV, Golcman EV. Sposoby hirurgicheskoy korrekcii dislokacij intraokuljarnyh linz i afakii (obzor literatury). *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I. P. Pavlova*. 2019; 26 (1): 20–28. Russian.
32. Nottage JM, Bhasin V, Nirankari VS. Long-term safety and visual outcomes of transscleral sutured posterior chamber IOLs and penetrating keratoplasty combined with transscleral sutured posterior chamber IOLs. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2009; 107: 242–50.
33. Egorova AV, Vasilev AV, Smoljakova GP. Rezul'taty hirurgicheskogo lechenija dislokacii intraokuljarnyh linz. *Oftal'mohirurgija*. 2017; 1: 6–9. Russian.
34. Sorokoletov GV, Dibina DA, Arisov AA, Molova ZA, avtory; FGBU «MNTK «Mikrohirurgija glaza» im. akad. S.N. Fedorova Minzdrava Rossii», patentoobladatel'. Sposob repozicii i podshivanija dislocirovannoj intraokuljarnoj linzy k raduzhnoj obolochke. Patent RF № 2765539. 31.01.2022. Russian.
35. Teplovodskaja VV, Dibina DA, Sudakova EP, Nosirov PO, avtory; FGBU «MNTK «Mikrohirurgija glaza» im. akad. S.N. Fedorova Minzdrava Rossii», patentoobladatel'. Sposob repozicii i flancevoj fiksacii dislocirovannoj intraokuljarnoj linzy vmeste s kapsul'nym meshkom k raduzhnoj obolochke (varianty). Patent RF № 2773103. 30.05.2022. Russian.
36. Ioshin IYe, Egorova YeV. Vnutrikapsul'noe kol'co — profilaktika oslozhnenij jekstrakcii katarakty pri podvyvihe hrustalika. *Oftal'mohirurgija*. 2002; 1: 25–28. Russian.
37. Shhuko AG, Mishhenko OP, Senchenko NYa, Jureva TN. Faktory riska i oslozhnenija, vznikajushhie pri pozdnieh spontannyh dislokacijah kompleksa «zadnekamernaja IOL — kapsul'nyj meshok» v steklovidnoe telo. *Oftal'mohirurgija*. 2017; 1: 21–26. Russian.
38. Binkhorst CD. Artificial pseudophakia. Long-term results obtained with the papillary lens (iris-clip lens) in the first twenty cases of unilateral aphakia. *Br J Ophthalmol*. 1962; 46: 947–56.
39. Epstein E. Modified Ridley lenses. Johannesburg, South Africa. *Br J Ophthalmol*. 1959; 43: 29–33.
40. Maruhnenco AM, Kadatskaja NV. FGBU «MNTK «Mikrohirurgija glaza» im. akad. S. N. Fedorova Minzdrava Rossii», patentoobladatel'. Sposob shovnoj fiksacii k raduzhke intraokuljarnoj linzy pri ee ljuksacii v steklovidnoe telo. Patent RF №2619748. 17.05.2017. Russian.
41. Worst JGF. Extracapsular surgery in lens implantation (Birkhorst lection). *Amer Intraocular Implant Soc J*. 1977; 13 (2): 102–04.
42. Chang DF. Siepser slipknot for McCannel iris-suture fixation of subluxated intraocular lenses. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2004; 30: 1170–6.
43. Maruhnenco AM, patentoobladatel'. Sposob fiksacii mjadkih intraokuljarnyh linz. Patent RF № 2141295. 20.11.1999. Russian.
44. Fechin OB, avtory; Akcionerное obshhestvo «Ekaterinburgskij centr MNTK "Mikrohirurgija glaza"», patentoobladatel'. Sposob implantacii i shovnoj fiksacii S-obraznoj intraokuljarnoj linzy k raduzhke. Patent RF №2017133687. 28.08.2018. Russian.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ РАСЧЕТА ТОРИЧЕСКОЙ ИНТРАОКУЛЯРНОЙ ЛИНЗЫ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ СКВОЗНОЙ КЕРАТОПЛАСТИКИ

М. В. Синицын , А. А. Воскресенская, Н. А. Поздеева

¹ Чебоксарский филиал Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени С. Н. Фёдорова» Минздрава России, Чебоксары, Россия

² Государственное автономное учреждение Чувашской Республики дополнительного профессионального образования «Институт усовершенствования врачей» Минздрава Чувашии, Чебоксары, Россия

Расчет торической интраокулярной линзы (тИОЛ) у пациентов после сквозной кератопластики (СКП) вызывает ряд сложностей. Целью исследования было провести сравнительный ретроспективный анализ различных способов расчета тИОЛ при факоэмульсификации катаракты (ФЭК) у пациентов после СКП. Был проведен анализ историй болезни 36 глаз (36 пациентов) после СКП, на которых была выполнена ФЭК с имплантацией тИОЛ. Все тИОЛ были пересчитаны четырьмя способами. В группе 1 расчет тИОЛ проводили с применением данных кератометрии передней поверхности роговичного трансплантата, измеренных при помощи кератотопографа, и задней поверхности роговичного трансплантата — при помощи оптической когерентной томографии роговицы или шаймпфлюг-кератотопографа). В группе 2 измерение кератометрии обеих поверхностей роговичного трансплантата выполняли при помощи шаймпфлюг-кератотопографа, в группе 3 — на ОКТ роговицы, в группе 4 — при помощи кератотопографа. Для расчета тИОЛ в группах 1–3 применяли онлайн-калькулятор Barrett True — K Toric Calculator, в группе 4 — The Kane Formula. Была отмечена статистически значимая разница по значениям сферического и цилиндрического компонентов рефракции между исследуемыми группами ($p < 0,05$). Наибольшая предсказуемость расчета тИОЛ обнаружена в группе 1: попадание в послеоперационную рефракцию по сферическому компоненту в пределах $\pm 0,5$ дптр — в 58% глаз и в пределах $\pm 1,0$ дптр — в 67% глаз, по цилиндрическому компоненту — в пределах $-0,5$ дптр — в 56% глаз и в пределах $-1,0$ дптр — в 89% глаз. Таким образом, наибольшая предсказуемость расчета тИОЛ была отмечена у пациентов группы 1.

Ключевые слова: сквозная кератопластика, посткератопластическая аметропия, торическая интраокулярная линза, способ расчета

Вклад авторов: М. В. Синицын — концепция и дизайн работы, сбор материала, анализ и обработка данных, статистическая обработка, написание текста; А. А. Воскресенская, Н. А. Поздеева — редактирование, утверждение версии, подлежащей публикации.

 **Для корреспонденции:** Максим Владимирович Синицын
пр. Тракторостроителей, д. 10, 428028, г. Чебоксары, Россия; mntksinich@mail.ru

Статья получена: 11.11.2024 **Статья принята к печати:** 01.12.2024 **Опубликована онлайн:** 22.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.063

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR CALCULATION OF TORIC INTRAOCULAR LENSES IN PATIENTS AFTER PENETRATING KERATOPLASTY

Sinitsyn MV , Voskresenskaya AA, Pozdeyeva NA

¹ Cheboksary branch of the Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Cheboksary, Russia

² Postgraduate Doctors' Training Institute of the Ministry of Public Health of Chuvashia, Cheboksary, Russia

Calculation of toric intraocular lenses (tIOLs) in patients after penetrating keratoplasty (PK) is challenging. The study aimed to perform comparative retrospective analysis of various methods for calculation of tIOL during phacoemulsification in patients after PK. We analyzed case reports of 36 eyes (36 patients) after PK, which underwent phacoemulsification with tIOL implantation. All tIOLs were recalculated using four different methods. In group 1, tIOL calculation was performed using keratometry data of the anterior surface of the corneal graft measured using a corneal topographer, and the posterior surface of the corneal graft measured using optical coherence tomography of the cornea or the Scheimpflug keratotopographer. In group 2, keratometry of both corneal graft surfaces was measured using the Scheimpflug keratotopographer, in group 3 — using OCT of the cornea, in group 4 — using the keratotopographer. The online Barrett True — K Toric Calculator was used to calculate tIOLs in groups 1–3, and The Kane Formula was used in group 4. There were significant differences in the values of the spherical and cylindrical components of refraction between the studied groups ($p < 0.05$). The highest predictability of tIOL calculation was reported for group 1: the ensured postoperative refraction for the spherical component was within ± 0.5 D in 58% of eyes, within ± 1.0 D in 67% of eyes; postoperative refraction for the cylindrical component was within -0.5 D in 56% of eyes, within -1.0 D in 89% of eyes. Thus, the highest predictability of tIOL calculation is observed in patients of group 1.

Keywords: penetrating keratoplasty, postkeratoplastic ametropia, toric intraocular lens, calculation method

Author contribution: Sinitsyn MV — study concept and design, data acquisition, data analysis and processing, statistical analysis, manuscript writing; Voskresenskaya AA, Pozdeyeva NA — editing, approval of the final version of the article.

 **Correspondence should be addressed:** Maxim V. Sinitsyn
pr. Traktorostroitelej, 10, 428028, Cheboksary, Russia; mntksinich@mail.ru

Received: 11.11.2024 **Accepted:** 01.12.2024 **Published online:** 22.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.063

Выполнение сквозной кератопластики (СКП) приводит практически у каждого пациента к возникновению посткератопластического роговичного астигматизма (РА) [1–3]. При возникновении катаракты у пациентов после СКП и необходимости выполнения ее экстракции большое значение приобретает точность выбранного способа расчета интраокулярной линзы (ИОЛ) [4–6]. Наиболее высокие функциональные результаты отмечают у пациентов при регулярном РА и выполнении экстракции катаракты с имплантацией торической ИОЛ (тИОЛ) [7–9].

Однако обсуждаемым остается вопрос способа расчета тИОЛ. Не все авторы учитывают при расчете тИОЛ кривизну задней поверхности роговичного трансплантата, считая, что ее преломление, как и в здоровой роговице, близко к преломлению лучей света влагой передней камеры. Поэтому часто используют кератометрические значения только передней поверхности роговичного трансплантата [10, 11]. В настоящее время применяют различные онлайн-калькуляторы, а также калькуляторы фирм-производителей тИОЛ, которые учитывают кривизну

обеих поверхностей роговичного трансплантата. Однако даже при применении кератометрических показателей обеих поверхностей роговичного трансплантата послеоперационные результаты значительно варьируют в связи с использованием различной диагностической аппаратуры [12, 13]. В связи с вышесказанным определение наиболее предсказуемого метода расчета тИОЛ при экстракции катаракты у пациентов после СКП обусловили актуальность и востребованность данного исследования.

Цель исследования — провести сравнительный ретроспективный анализ различных способов расчета тИОЛ при экстракции катаракты у пациентов после СКП.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Был проведен ретроспективный анализ историй болезни 36 глаз (36 пациентов) после СКП, которым была выполнена факоэмульсификация катаракты (ФЭК) с имплантацией тИОЛ. Всем пациентам имплантировали тИОЛ RayOne Toric RAO610T (Rayner, Великобритания). Возраст вошедших в клиническое исследование пациентов (12 мужчин и 24 женщины) составил 31–76 лет (средний возраст 57 ± 13 лет). В анамнезе СКП была выполнена по поводу наследственной дистрофии роговицы в шести глазах, пеллюцидной дегенерации роговицы — в восьми, центрального рубца роговицы — в шести, помутнения роговицы после язвы — в шести, кератоконуса IV стадии — в шести, вторичной кератэктазии — в четырех глазах. Срок между ФЭК и выполнением СКП у пациентов составил 4–15 лет. Все роговичные трансплантаты были прозрачными. Диаметр роговичного трансплантата достигал 7,5–8,5 мм (в среднем — $8,14 \pm 0,36$ мм).

При расчете тИОЛ измерение длины глаза, глубины передней камеры, толщины хрусталика, расстояние «от белого до белого» проводили с помощью оптической биометрии на приборе IOL Master 500 (Carl Zeiss AG, Германия). Значения кератометрических данных и оси расположения главных меридианов передней поверхности роговичного трансплантата определяли при помощи кератотопографа TMS-5 (Tomey, Япония), шаймпфлюг-кератотопографа Pentacam (Oculus Optikgerate GmbH, Германия), оптической когерентной томографии (ОКТ) роговицы на аппарате CASIA 2 (Tomey, Япония). Значения кератометрических данных и оси расположения главных меридианов задней поверхности роговичного трансплантата оценивали при помощи шаймпфлюг-кератотопографа Pentacam и оптического когерентного томографа (ОКТ) роговицы CASIA 2. У всех пациентов по данным кератотопограмм до ФЭК был диагностирован регулярный РА.

При расчете тИОЛ в калькуляторы вводили значения А-константы 118,6 тИОЛ RayOne Toric RAO610T, Lens Factor, индуцированного астигматизма, положения основного разреза, рефракции цели, толщины роговичного трансплантата в центре. Расчет тИОЛ проводили по онлайн-калькуляторам Barrett True-K Toric Calculator и The Kane Formula.

По данным историй болезни у части пациентов при расчете тИОЛ были получены расхождения в значениях оптической силы и торического компонента тИОЛ в связи с различными кератометрическими данными передней поверхности роговичного трансплантата, измеренными с помощью кератотопографа, ОКТ роговицы и шаймпфлюг-кератотопографа. В этих случаях брали либо среднее значение кератометрических показателей, измеренных с помощью вышеуказанной диагностической аппаратуры, либо среднее значение близких по результатам кератометрических показателей.

Из карт историй болезни были также взяты показатели сферического (Sph) и цилиндрического компонентом рефракции (Cyl) через три месяца и позже после ФЭК, когда была отмечена стабилизация данных параметров.

Для определения наиболее предсказуемого метода расчета тИОЛ мы разделили их на четыре группы в зависимости от используемых диагностических приборов для измерения кератометрических показателей (табл. 1).

В группе 1 при измерении кератометрических показателей передней поверхности роговичного трансплантата использовали кератотопограф (TMS-5), задней поверхности — шаймпфлюг-кератотопографа (Pentacam) или ОКТ роговицы (CASIA 2), учитывая сопоставимые данные кератометрии задней поверхности роговичного трансплантата, получаемые данными приборами. В группе 2 кератометрические данные обеих поверхностей роговичного трансплантата измеряли с помощью шаймпфлюг-кератотопографа (Pentacam), в группе 3 — с помощью ОКТ роговицы (CASIA 2). В группе 4 измеряли кривизну только передней поверхности роговичного трансплантата при помощи кератотопографа (TMS-5).

В группах 1–4 для расчета тИОЛ использовали онлайн-калькулятор Barrett True-K Toric Calculator, так как он позволяет учитывать данные кератометрии обеих поверхностей роговичного трансплантата. В группе 4 расчет тИОЛ проводили при помощи онлайн-калькулятора The Kane Formula, позволяющего анализировать только данные кератометрии передней поверхности роговичного трансплантата.

Расчет оптической силы тИОЛ во всех группах проводили на эмметропическую рефракцию цели, торического компонента — на полную коррекцию суммарного РА в группах 1–3 и на коррекцию РА передней поверхности роговичного трансплантата в группе 4.

На основании данных оптической силы и торического компонента имплантированных тИОЛ, а также послеоперационного рефракционного результата был проведен сравнительный анализ предсказуемости расчета тИОЛ, пересчитанных различными методами в группах 1–4.

Анализ статистических данных проводили в программе IBM SPSS Statistics 20. Для оценки нормальности распределений исследуемых показателей использовали критерий Шапиро–Уилка. В связи с нормальным распределением значений исследуемых показателей в

Таблица 1. Методы расчета торической интраокулярной линзы при экстракции катаракты у пациентов после сквозной кератопластики

Группы	Измерение кератометрических данных	
	Передняя поверхность роговичного трансплантата	Задняя поверхность роговичного трансплантата
1	Кератотопограф (TMS-5)	ОКТ (CASIA 2) или шаймпфлюг-кератотопограф (Pentacam)
2	Шаймпфлюг-кератотопограф (Pentacam)	Шаймпфлюг-кератотопограф (Pentacam)
3	ОКТ роговицы (CASIA 2)	ОКТ роговицы (CASIA 2)
4	Кератотопограф (TMS-5)	Кератометрия не учитывалась

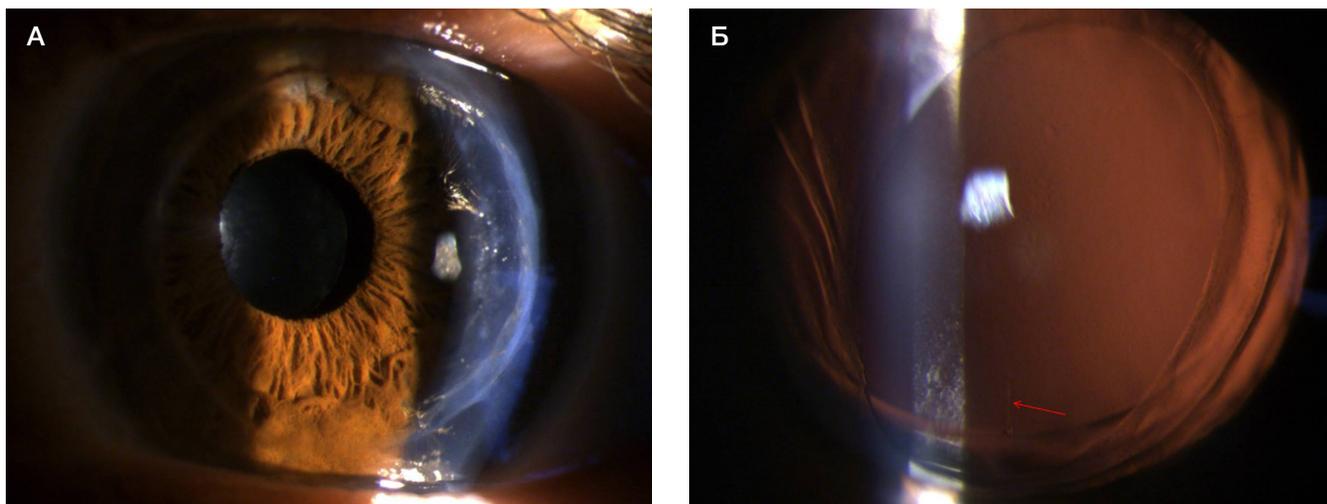


Рис. 1. Фото глаза пациента Н., 56 лет, при биомикроскопии на 1-е сутки после факэмульсификации катаракты с имплантацией торической интраокулярной линзы. **А.** Визуализируется прозрачный роговичный трансплантат, в проекции зрачка — оптическая часть торической интраокулярной линзы. **Б.** Фото глаза на фоне медикаментозного мидриаза, визуализируется вертикально расположенная метка торической оси интраокулярной линзы (отмечена красной стрелкой), расположенная по сильному меридиану кератометрии роговичного трансплантата

каждой из групп сравнения для оценки статистически значимой разницы исследуемых показателей между двумя группами использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента для независимых переменных, между тремя группами — однофакторный дисперсионный анализ. Различия исследуемых показателей между двумя группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$, между тремя группами — при $p < 0,017$. Значения исследуемых параметров были представлены в виде $M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным историй болезни после выполненных ФЭК интра- и послеоперационных осложнений ни у одного из пациентов отмечено не было. При биомикроскопии у всех пациентов на следующий день после операции оптические среды были прозрачными, тИОЛ центрированы (рис. 1).

Дооперационные данные среднего значения РА, как и кератометрии (Кср) передней поверхности роговичного трансплантата, статистически различались по данным кератотопографа (TMS-5), шаймпфлюг-кератотопографа

(Pentacam) и ОКТ роговицы (CASIA 2), а РА, как и Кср задней поверхности роговичного трансплантата, были сопоставимы по данным шаймпфлюг-кератотопографа и ОКТ роговицы (табл. 1, 2).

Разница более 5° в расположении осей главных меридианов передней и задней поверхностей роговичного трансплантата по данным шаймпфлюг-кератотопографа была отмечена в 12 глазах (33,3%), по данным ОКТ роговицы — в 15 глазах (41,7%).

Результаты дооперационного анализа РА задней поверхности роговичного трансплантата по данным шаймпфлюг-кератотопографа и ОКТ роговицы представлены в виде диаграмм (рис. 2).

Частота встречаемости РА задней поверхности роговичного трансплантата по данным ОКТ роговицы в пределах $\leq -0,3$ дптр составила 11% и в пределах $\leq -1,0$ дптр — 56% (рис. 1). Частота встречаемости РА задней поверхности по данным шаймпфлюг-кератотопографа в пределах $\leq -0,3$ дптр составила 11% и в пределах $\leq -1,0$ дптр — 44%. Таким образом, средняя частота встречаемости РА задней поверхности в пределах $\leq -0,3$ дптр по данным обоих приборов составила 11%.

Таблица 2. Дооперационные данные среднего значения роговичного астигматизма обеих поверхностей роговичного трансплантата, измеренного различными приборами ($M \pm \sigma$)

Астигматизм роговичного трансплантата	Приборы			<i>p</i>
	Кератотопограф (TMS-5), дптр	Шеймпфлюг-кератотопограф (Pentacam), дптр	ОКТ роговицы (CASIA 2), дптр	
Передняя поверхность	$-6,15 \pm 3,28$	$-5,81 \pm 2,89$	$-6,72 \pm 3,23$	0,0105
	(от $-2,5$ до $-10,5$)	(от $-2,1$ до $-10,8$)	(от $-1,8$ до $-11,7$)	
Задняя поверхность	нет данных	$-1,05 \pm 0,63$	$-1,04 \pm 0,60$	0,4115
		(от $-0,1$ до $-1,8$)	(от $-0,3$ до $-1,9$)	

Таблица 3. Дооперационные данные среднего значения кератометрии обеих поверхностей роговичного трансплантата, измеренного различными приборами ($M \pm \sigma$)

Кср роговичного трансплантата	Приборы			<i>p</i>
	Кератотопограф (TMS-5), дптр	Шеймпфлюг-кератотопограф (Pentacam), дптр	ОКТ роговицы (CASIA 2), дптр	
Передняя поверхность	$44,07 \pm 4,20$ (от $39,16$ до $49,72$)	$44,69 \pm 4,14$ (от $39,5$ до $49,1$)	$45,89 \pm 4,34$ (от $39,2$ до $49,9$)	0,0122
Задняя поверхность	нет данных	$5,77 \pm 0,75$ (от $4,4$ до $6,8$)	$7,24 \pm 1,08$ (от $5,9$ до $8,6$)	0,1225

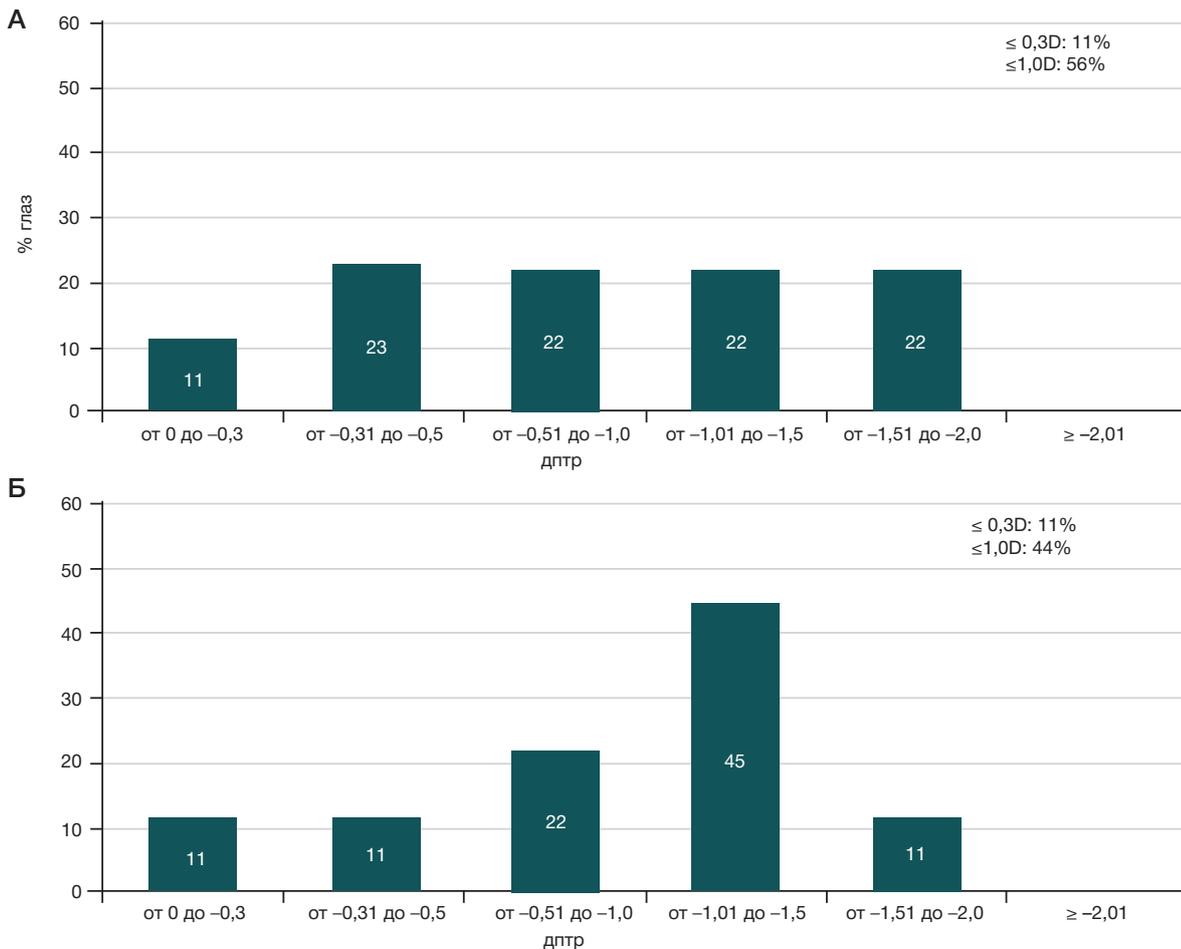


Рис. 2. Диаграммы распределения дооперационных значений роговичного астигматизма задней поверхности роговичного трансплантата по данным ОКТ роговицы (CASIA 2) (А), шеймпфлюг-кератотопографа (Pentacam) (Б)

При расчете оптической силы тИОЛ отмечено попадание в запланированную рефракцию цели по Sph в группе 1 в пределах $\pm 0,5$ дптр в 58% глаз, $\pm 1,0$ дптр — в 66% глаз, в группе 2 в пределах $\pm 0,5$ дптр — в 33% глаз, $\pm 1,0$ дптр — в 49% глаз, в группе 3 в пределах $\pm 0,5$ дптр — в 17% глаз, $\pm 1,0$ дптр — в 25% глаз, в группе 4 в пределах $\pm 0,5$ дптр — нет, $\pm 1,0$ дптр — в 17% глаз (рис. 3).

Наибольшая предсказуемость попадания в рефракцию цели по Sph отмечена при расчете оптической силы тИОЛ в группе 1, наименьшая предсказуемость — в группе 4 (рис. 2).

При расчете торического компонента тИОЛ отмечено попадание по СуI в группе 1 в пределах $-0,5$ дптр в 56% глаз, $-1,0$ дптр — в 89% глаз, в группе 2 в пределах $-0,5$ дптр — в 22% глаз, $-1,0$ дптр — в 44% глаз, в группе 3 в пределах $-0,5$ дптр — в 22% глаз, $-1,0$ дптр — в 33% глаз, в группе 4 в пределах $-0,5$ дптр — в 6% глаз, $-1,0$ дптр — в 17% глаз (рис. 4).

Наибольшая предсказуемость попадания в рефракцию цели по СуI отмечена при расчете торического компонента тИОЛ в группе 1, наименьшая предсказуемость — группе 4 (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учитывая, что практически у каждого пациента после СКП возникает РА, выполнение экстракции катаракты с имплантацией тИОЛ позволяет за одну операцию решить проблему с катарактой и одновременно скорректировать

РА. Однако точность расчета тИОЛ у пациентов после СКП имеет много особенностей. Во-первых, сложность расчета тИОЛ возникает из-за затруднения в выборе наиболее точного его калькулятора. В настоящее время существуют два вида калькуляторов тИОЛ: учитывающие кривизну только передней поверхности роговицы или кривизну ее обеих поверхностей. Как известно, в норме, преломление задней поверхности роговицы очень приближено к преломлению лучей влаги передней камеры, в связи с чем кератометрией ее задней поверхности пренебрегают многие авторы. Однако при выполнении на роговице операций кератометрические показатели ее задней поверхности могут меняться. По некоторым данным, РА задней поверхности роговицы в норме составляет в среднем $-0,3$ дптр, и только 9% глаз имеют РА задней поверхности роговицы более $-0,5$ дптр [14]. В нашем исследовании у пациентов после СКП все прямо противоположно. Лишь 11% глаз имеют РА задней поверхности роговичного трансплантата в пределах $\leq -0,3$ дптр, в 44% глаз по данным ОКТ и в 56% глаз по данным шеймпфлюг-кератотопографа он выше $-1,0$ дптр. Поэтому его необходимо учитывать, чтобы точно подобрать торический компонент тИОЛ.

Следующим моментом, который может привести к ошибке в расчете тИОЛ, является расположение главных меридианов передней и задней поверхностей роговичного трансплантата. Как известно, при совпадении осей главных меридианов обеих поверхностей роговичного трансплантата РА задней поверхности компенсирует

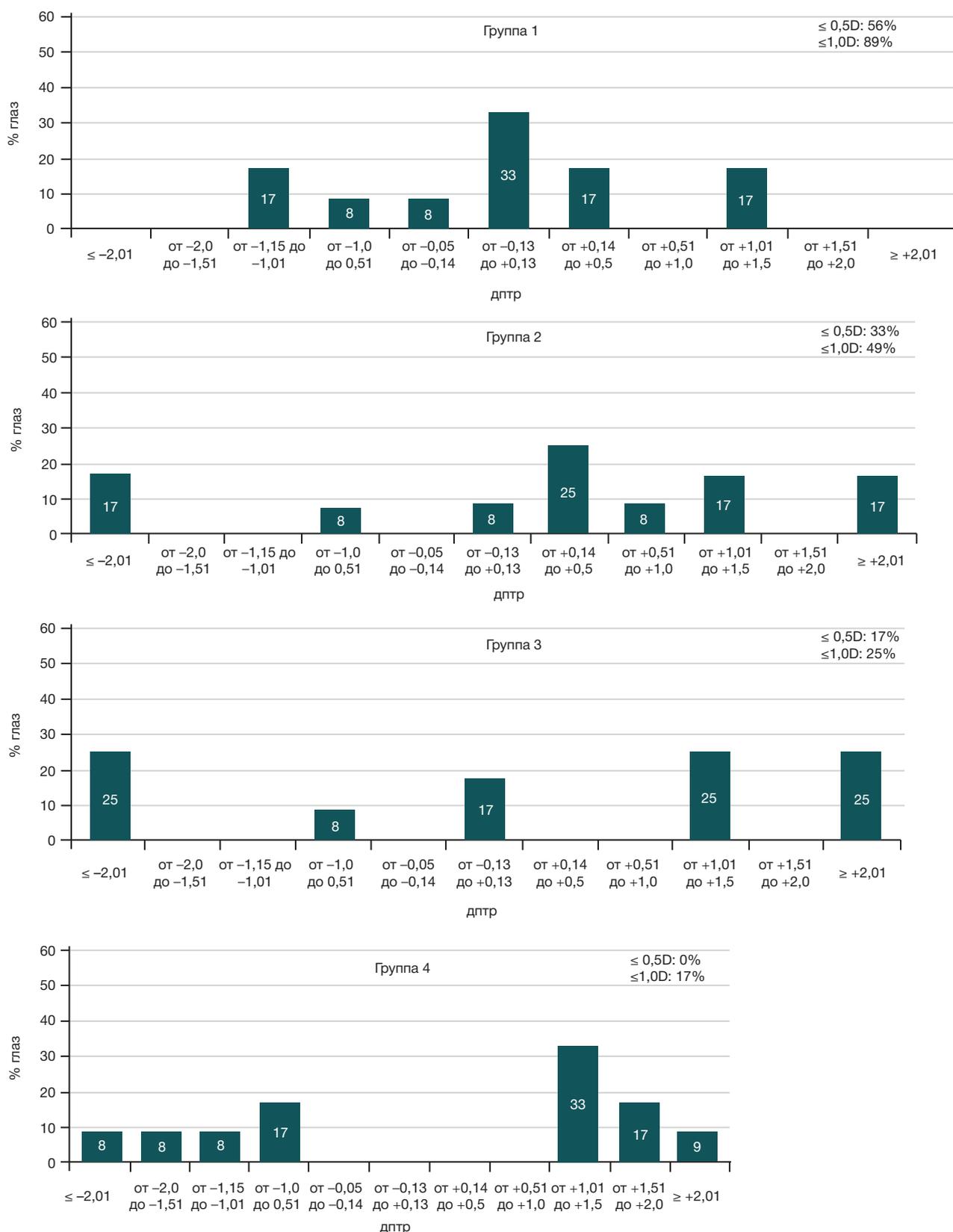


Рис. 3. Предсказуемость сферического компонента рефракции при расчете оптической силы тИОЛ в группах 1–4

на свою величину значение РА передней поверхности, что приводит к снижению суммарного РА. Это необходимо учитывать вместе с величиной индуцированного астигматизма при расчете торического компонента тИОЛ, чтобы не перекорректировать и не перевернуть ось РА на противоположную. Большое значение имеет

также расположение осей главных меридианов обеих поверхностей роговичного трансплантата. Если они отличаются не более чем на 5°, то тИОЛ может сразу скорректировать весь суммарный РА, иначе РА задней поверхности роговицы останется и в зависимости от своей величины (в нашем исследовании он достигал

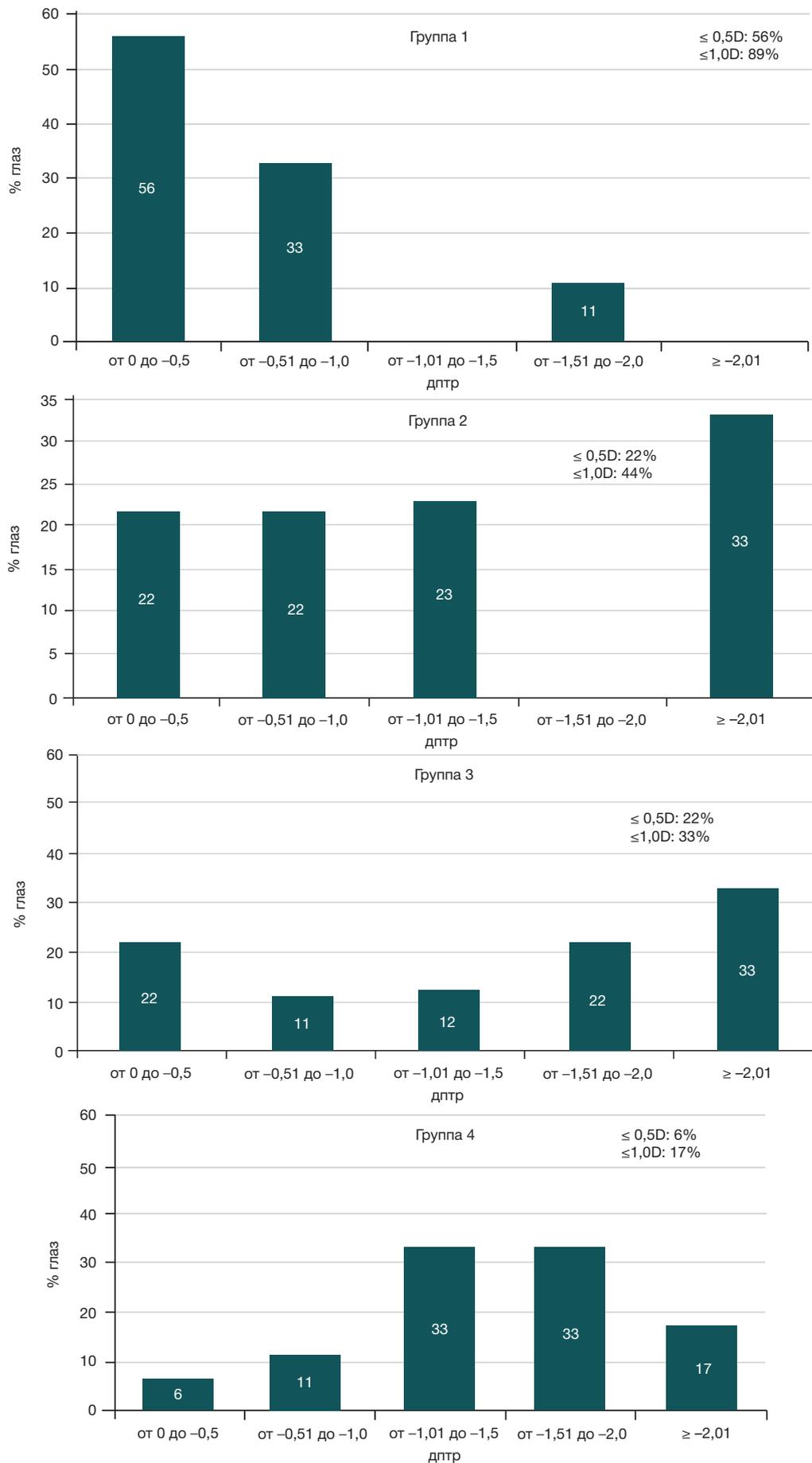


Рис. 4. Предсказуемость цилиндрического компонента рефракции при расчете торического компонента тИОЛ в группах 1–4

1,8–1,9 дптр) может снижать зрение после операции. В данном исследовании разница в расположении главных меридианов обеих поверхностей роговичного трансплантата была более 5° по данным шаймпфлюг-кератотопографа в 33,3% глаз, по данным ОКТ роговицы — в 41,7% глаз. В этих случаях РА задней поверхности остается после имплантации тИОЛ.

Следующим моментом является выбор прибора, результаты которого будут наиболее точны при расчете тИОЛ. По результатам данного исследования кератометрические показатели задней поверхности роговичного трансплантата сопоставимо измеряют как ОКТ роговицы, так и шаймпфлюг-кератотопограф. Разница заключается в измерении кератометрии передней поверхности роговичного трансплантата. По результатам исследования наибольшую предсказуемость по сферическому и цилиндрическому компонентам рефракции продемонстрировал способ расчета тИОЛ в группе 1, при котором кератометрические показатели передней поверхности роговичного трансплантата измеряли с помощью кератотопографа, работающего с использованием принципа колец Пласидо, и задней поверхности роговичного трансплантата — с помощью ОКТ роговицы или шаймпфлюг-кератотопографа. Наименьшая предсказуемость расчета тИОЛ была в группе 4, что может объясняться расчетом тИОЛ без учета кривизны задней поверхности роговичного трансплантата.

В настоящее время существует несколько калькуляторов тИОЛ, которые учитывают кератометрию обеих поверхностей роговичного трансплантата. В нашем исследовании значение одного из главных меридианов задней поверхности роговичного трансплантата было более 7,5 дптр в 12 глазах (34,3%), что позволяет их ввести только в онлайн-калькуляторе Barrett True-K Toric Calculator.

По данным литературы, рефракционные результаты экстракции катаракты с имплантацией тИОЛ различаются из-за применения авторами не только разных калькуляторов расчета тИОЛ, но и кератометрических данных с различных диагностических приборов. Так, было проведено клиническое исследование по коррекции РА после СКП более 2,25 дптр на 67 глазах (45 пациентов) с катарактой методом ФЭК с имплантацией тИОЛ Acrysof Toric SN60T6–SN60T9 [15]. После операции НКОЗ составил

$0,61 \pm 0,26$, КОЗ — $0,81 \pm 0,21$. Послеоперационный цилиндрический компонент рефракции (ЦКР) был менее 0,75 дптр у 62% глаз и менее 1,00 дптр — у 81% глаз [15]. В 2021 г. опубликованы результаты клинического исследования по коррекции роговичного астигматизма высокой степени (от 6 до 10 дптр) после СКП у пациентов с катарактой методом ФЭК с имплантацией тИОЛ. После операции среднее значение НКОЗ увеличилось с $0,04 \pm 0,02$ до $0,6 \pm 0,14$, ЦКР снизился с $-9,0 \pm 1,80$ до $-1,1 \pm 0,45$ дптр, среднее значение послеоперационного сферозэквивалента составило $0,75 \pm 0,5$ дптр [7]. В 2022 г. представлены результаты ФЭК с имплантацией тИОЛ у пациентов после СКП с регулярной формой роговичного астигматизма более 1,5 дптр. После операции НКОЗ увеличилась с $0,1 \pm 0,02$ до $0,38 \pm 0,11$, КОЗ — с $0,23 \pm 0,07$ до $0,78 \pm 0,12$, послеоперационный ЦКР составил $0,93 \pm 0,87$ дптр [5].

Таким образом, наиболее предсказуемым будет метод расчета тИОЛ, при котором в калькулятор, учитывающий кератометрические данные обеих поверхностей роговичного трансплантата, будут внесены данные передней поверхности роговичного трансплантата, измеренные с помощью кератотопографа, работающего с использованием принципа колец Пласидо, и задней поверхности роговичного трансплантата — с помощью ОКТ роговицы или шаймпфлюг-кератотопографа.

ВЫВОДЫ

Проведенный сравнительный ретроспективный анализ различных методов расчета тИОЛ при экстракции катаракты у пациентов после СКП показал наибольшую предсказуемость попадания в запланированную рефракцию цели в группе 1. При расчете оптической силы и торического компонента интраокулярной линзы целесообразно использовать калькуляторы, учитывающие кератометрические показатели обеих поверхностей роговичного трансплантата, а именно кератометрические данные передней поверхности роговичного трансплантата, измеренные при помощи кератотопографа, работающего с использованием колец Пласидо, и кератометрические показатели задней поверхности роговичного трансплантата, измеренные при помощи оптического когерентного томографа роговицы или шаймпфлюг-кератотопографа.

Литература

- Deshmukh R, Nair S, Vaddavalli PK, Agrawal T, Rapuano CJ, Beltz J, et al. Post-penetrating keratoplasty astigmatism. *Surv Ophthalmol.* 2022; 67 (4): 1200–28. DOI: 10.1016/j.survophthal.2021.11.005.
- Kijonka M, Nowińska A, Wylegała E, Wylegała A, Wróblewska-Czajka E, Kryszan K, et al. Postoperative Astigmatism after Keratoplasty: A Systematic Review Meta-Analysis Based on PRISMA. *J Clin Med.* 2024; 13 (11): 3306. DOI: 10.3390/jcm13113306.
- Alió JL, Niaz S, Doroodgar F, Barrio JLAD, Hashemi H, Javadi MA. Main issues in penetrating keratoplasty. *Taiwan J Ophthalmol.* 2024; 14 (1): 50–58. DOI: 10.4103/tjo.TJO-D-24-00001.
- Den S, Shimmura S, Shimazaki J. Cataract surgery after deep anterior lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in age- and disease-matched eyes. *J Cataract Refract Surg.* 2018; 44 (4): 496–503. DOI: 10.1016/j.jcrs.2018.01.024.
- Pellegrini M, Furiosi L, Yu AC, Giannaccare G, Scuteri G, Gardeli I, et al. Outcomes of cataract surgery with toric intraocular lens implantation after keratoplasty. *J Cataract Refract Surg.* 2022; 48 (2): 157–61. DOI: 10.1097/j.jcrs.0000000000000730.
- Tang Q, Yao K. Challenges in cataract surgery after penetrating keratoplasty managed using femtosecond laser: A series of 3 case reports. *Medicine (Baltimore).* 2024; 103 (25): e38614. DOI: 10.1097/MD.00000000000038614.
- Reddy JK, Pooja CM, Prabhakar GV. High power custom toric intraocular lens for correcting high corneal astigmatism in post-keratoplasty and keratoconus patients with cataract. *Indian J Ophthalmol.* 2021; 69 (7): 1766–68. DOI: 10.4103/ijo.IJO_2640_20.
- Moreno-Martínez A, Martín-Melero O, Andrés-Pretel F, Gómez-Cortés A, Granados-Centeno JM. Outcomes of Phacoemulsification With Toric Intraocular Lenses in Addressing Postkeratoplasty Astigmatism. *Cornea.* 2024; 43 (1): 76–82. DOI: 10.1097/ICO.0000000000003288.
- Jeeva IK, Masud S, Ali TS, Siddiqui MAR, Waheed AA, Awan A. Evaluation of visual outcomes with toric intraocular lens implantation using digital marker during cataract surgery. *J Pak Med Assoc.* 2024; 74 (3): 450–5. DOI: 10.47391/JPMA.8008.
- Alfonso-Bartolozzi B, Fernández-Vega-Cueto L, Fernández-Vega L, Martínez-Alberquilla I, Madrid-Costa D, Alfonso JF. Triple Procedure: A Stepwise Combination of Deep Anterior Lamellar

- Keratoplasty and Cataract Surgery. *Cornea*. 2024; 43 (3): 301–6. DOI: 10.1097/ICO.0000000000003364.
11. Krysik K, Lyssek-Boron A, Janiszewska-Bil D, Wylegala E, Dobrowolski D. Impact of ultrasound and optical biometry on refractive outcomes of cataract surgery after penetrating keratoplasty in keratoconus. *Int J Ophthalmol*. 2019; 12 (6): 949–53. DOI: 10.18240/ijo.2019.06.11.
 12. Lin H, Zhang J, Niu GZ, Huang XY, Zhang YS, Liu CY, et al. Phacoemulsification in eyes with corneal opacities after deep anterior lamellar keratoplasty. *Int J Ophthalmol*. 2019; 12 (8): 1344–47. DOI: 10.18240/ijo.2019.08.17.
 13. Синицын М. В., Поздеева Н. А. Коррекция иррегулярного посткератопластического астигматизма у пациентов с катарактой. *The EYE ГЛАЗ*. 2023; 25 (2): 99–107. DOI: 10.33791/2222-4408-2023-2-99-107.
 14. Koch DD, Ali SF, Weikert MP, Shirayama M, Jenkins R, Wang L. Contribution of posterior corneal astigmatism to total corneal astigmatism. *J Cataract Refract Surg*. 2012; 38 (12): 2080–87. DOI: 10.1016/j.jcrs.2012.08.036.
 15. Visser N, Ruíz-Mesa R, Pastor F, Bauer NJ, Nuijts RM, Montés-Micó R. Cataract surgery with toric intraocular lens implantation in patients with high corneal astigmatism. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37 (8): 1403–10. DOI: 10.1016/j.jcrs.2011.03.034.

References

1. Deshmukh R, Nair S, Vaddavalli PK, Agrawal T, Rapuano CJ, Beltz J, et al. Post-penetrating keratoplasty astigmatism. *Surv Ophthalmol*. 2022; 67 (4): 1200–28. DOI: 10.1016/j.survophthal.2021.11.005.
2. Kijonka M, Nowińska A, Wylegala E, Wylegala A, Wróblewska-Czajka E, Kryszan K, et al. Postoperative Astigmatism after Keratoplasty: A Systematic Review Meta-Analysis Based on PRISMA. *J Clin Med*. 2024; 13 (11): 3306. DOI: 10.3390/jcm13113306.
3. Alió JL, Niazi S, Doroodgar F, Barrio JLAD, Hashemi H, Javadi MA. Main issues in penetrating keratoplasty. *Taiwan J Ophthalmol*. 2024; 14 (1): 50–58. DOI: 10.4103/tjo.TJO-D-24-00001.
4. Den S, Shimmura S, Shimazaki J. Cataract surgery after deep anterior lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty in age- and disease-matched eyes. *J Cataract Refract Surg*. 2018; 44 (4): 496–503. DOI: 10.1016/j.jcrs.2018.01.024.
5. Pellegrini M, Furioli L, Yu AC, Giannaccare G, Scuteri G, Gardeli I, et al. Outcomes of cataract surgery with toric intraocular lens implantation after keratoplasty. *J Cataract Refract Surg*. 2022; 48 (2): 157–61. DOI: 10.1097/j.jcrs.0000000000000730.
6. Tang Q, Yao K. Challenges in cataract surgery after penetrating keratoplasty managed using femtosecond laser: A series of 3 case reports. *Medicine (Baltimore)*. 2024; 103 (25): e38614. DOI: 10.1097/MD.00000000000038614.
7. Reddy JK, Pooja CM, Prabhakar GV. High power custom toric intraocular lens for correcting high corneal astigmatism in post-keratoplasty and keratoconus patients with cataract. *Indian J Ophthalmol*. 2021; 69 (7): 1766–68. DOI: 10.4103/ijo.IJO_2640_20.
8. Moreno-Martínez A, Martín-Melero O, Andrés-Pretel F, Gómez-Cortés A, Granados-Centeno JM. Outcomes of Phacoemulsification With Toric Intraocular Lenses in Addressing Postkeratoplasty Astigmatism. *Cornea*. 2024; 43 (1): 76–82. DOI: 10.1097/ICO.0000000000003288.
9. Jeeva IK, Masud S, Ali TS, Siddiqui MAR, Waheed AA, Awan A. Evaluation of visual outcomes with toric intraocular lens implantation using digital marker during cataract surgery. *J Pak Med Assoc*. 2024; 74 (3): 450–5. DOI: 10.47391/JPMA.8008.
10. Alfonso-Bartolozzi B, Fernández-Vega-Cueto L, Fernández-Vega L, Martínez-Alberquilla I, Madrid-Costa D, Alfonso JF. Triple Procedure: A Stepwise Combination of Deep Anterior Lamellar Keratoplasty and Cataract Surgery. *Cornea*. 2024; 43 (3): 301–6. DOI: 10.1097/ICO.0000000000003364.
11. Krysik K, Lyssek-Boron A, Janiszewska-Bil D, Wylegala E, Dobrowolski D. Impact of ultrasound and optical biometry on refractive outcomes of cataract surgery after penetrating keratoplasty in keratoconus. *Int J Ophthalmol*. 2019; 12 (6): 949–53. DOI: 10.18240/ijo.2019.06.11.
12. Lin H, Zhang J, Niu GZ, Huang XY, Zhang YS, Liu CY, et al. Phacoemulsification in eyes with corneal opacities after deep anterior lamellar keratoplasty. *Int J Ophthalmol*. 2019; 12 (8): 1344–47. DOI: 10.18240/ijo.2019.08.17.
13. Sinitsyn MV, Pozdeeva NA. Correction of irregular postkeratoplastic astigmatism in patients with cataract. *The EYE GLAZ*. 2023; 25 (2): 99–107. Russian.
14. Koch DD, Ali SF, Weikert MP, Shirayama M, Jenkins R, Wang L. Contribution of posterior corneal astigmatism to total corneal astigmatism. *J Cataract Refract Surg*. 2012; 38 (12): 2080–87. DOI: 10.1016/j.jcrs.2012.08.036.
15. Visser N, Ruíz-Mesa R, Pastor F, Bauer NJ, Nuijts RM, Montés-Micó R. Cataract surgery with toric intraocular lens implantation in patients with high corneal astigmatism. *J Cataract Refract Surg*. 2011; 37 (8): 1403–10. DOI: 10.1016/j.jcrs.2011.03.034.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОВИТРЕАЛЬНОЙ ИЛЛЮМИНАЦИИ НА ОКСИДАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ КРОЛИКОВ

Р. Р. Ямгутдинов^{1,2} ✉, Т. Р. Мухамадеев¹, Р. Р. Ахмадеев¹, К. С. Мочалов¹¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия² Городская клиническая больница № 8, Уфа, Россия

Актуальной проблемой офтальмологии является исследование механизмов фотоповреждений сетчатки, происходящих во время витреоретинальных вмешательств. Цель исследования — оценить влияние эндоиллюминации различной интенсивности и продолжительности на изменение окислительных процессов в крови кроликов. Эксперимент проводили на 16 кроликах, сетчатку которых подвергали воздействию эндоиллюминации разной продолжительности (30 и 60 мин) и интенсивности (8 и 16 кд/м²). Образцы крови из ушной вены кролика забирали до и после светового воздействия. Для оценки окислительных процессов измеряли биохемилюминесценцию в цельной крови и сыворотке крови. Данные анализировали с использованием *U*-теста Манна–Уитни, а результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$. При 30-минутной световой экспозиции в цельной крови было зафиксировано статистически значимое увеличение биохемилюминесценции: в 1,5 раза при интенсивности 8 кд/м² и в 2,5 раза при интенсивности 16 кд/м² по сравнению с контрольными показателями ($p < 0,05$), что отражает усиление генерации активных форм кислорода клетками крови. В сыворотке, напротив, выявлено достоверное снижение уровней биохемилюминесценции: в 1,2 раза при интенсивности 8 кд/м² и в 2 раза при интенсивности 16 кд/м² относительно контроля ($p < 0,05$), что, очевидно, может свидетельствовать о компенсаторном увеличении антиокислительной активности в ответ на гиперактивацию свободнорадикальных процессов. При 60-минутной экспозиции изменения биохемилюминесценции имели более выраженный характер: усиление в цельной крови в 3 и 7 раз, и снижение в сыворотке крови в 2 и 3 раза соответственно. Таким образом, при интенсивном световом воздействии отмечено изменение окислительных процессов, определяемое временем и длительностью воздействия.

Ключевые слова: эндоиллюминация, витреоретинальная хирургия, фототоксичность, биохемилюминесценция, окислительные процессы**Вклад авторов:** Р. Р. Ямгутдинов — идея, планирование эксперимента, сбор и обработка данных, написание и редактирование статьи; Т. Р. Мухамадеев — планирование, редактирование; Р. Р. Ахмадеев — планирование, редактирование; К. С. Мочалов — идея, написание и редактирование статьи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено ЛЭК ФГБОУ ВО БГМУ (протокол № 10 от 11 декабря 2017 г.).✉ **Для корреспонденции:** Ринат Радикович Ямгутдинов
ул. Академика Королева, д. 35, г. Уфа, 450105, Россия; yamgrin@gmail.com**Статья получена:** 30.09.2024 **Статья принята к печати:** 30.10.2024 **Опубликована онлайн:** 15.11.2024**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.049

EFFECT OF ENDOILLUMINATION DURING VITRECTOMY ON OXIDATIVE PROCESSES IN RABBIT BLOOD

Yamgutdinov RR^{1,2} ✉, Mukhamadeev TR¹, Ahmadeev RR¹, Mochalov KS¹¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia² City Clinical Hospital No. 8, Ufa, Russia

Investigation of the mechanisms underlying retinal photodamage occurring during vitreoretinal interventions is a topical issue of ophthalmology. The study aimed to assess the effect of endoillumination of varying intensity and duration on alteration of oxidative processes in rabbit blood. The experiment involved 16 rabbits, with their retinas exposed to endoillumination of different duration (30 and 60 min) and intensity (8 and 16 cd/m²). Blood samples were collected from the rabbits' ear vein before and after light exposure. Whole blood and serum biochemiluminescence was measured in order to assess oxidative processes. The data were analyzed using the Mann–Whitney *U*-test, and the results were considered significant at $p \leq 0.05$. A 30-minute light exposure resulted in a significant increase in whole blood biochemiluminescence: 1.5-fold at the intensity of 8 cd/m² and 2.5-fold at the intensity of 16 cd/m² relative to control values ($p < 0.05$), indicating enhanced reactive oxygen species generation by blood cells. In contrast, a significant decrease in serum biochemiluminescence was revealed: 1.2-fold at the intensity of 8 cd/m² and 2-fold at the intensity of 16 cd/m² compared to control ($p < 0.05$), which likely indicates a compensatory increase in antioxidant activity in response to hyperactivation of free radical processes. With the 60-minute exposure, the changes in biochemiluminescence were more pronounced: 3- and 7-fold increase in whole blood biochemiluminescence and 2- and 3-fold decrease in serum biochemiluminescence, respectively. Thus, intense light exposure resulted in the oxidative process alterations determined by the intensity and duration of exposure.

Keywords: endoillumination, vitreoretinal surgery, phototoxicity, biochemiluminescence, oxidative processes**Author contribution:** Yamgutdinov RR — idea, planning the experiment, data acquisition and processing, manuscript writing and editing; Mukhamadeev TR — planning, manuscript editing; Ahmadeev RR — planning, manuscript editing; Mochalov KS — idea, manuscript writing and editing.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Bashkir State Medical University (protocol No. 10 dated 11 December 2017).✉ **Correspondence should be addressed:** Rinat R. Yamgutdinov
Akademika Koroleva, 35, Ufa, 450105, Russia; yamgrin@gmail.com**Received:** 30.09.2024 **Accepted:** 30.10.2024 **Published online:** 15.11.2024**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.049

Одним из важных условий проведения витреоретинальной хирургии является достаточная интраоперационная визуализация внутриглазных структур, что достигается за счет внешних источников внутриглазного освещения [1–3]. Разработка новых источников освещения для эндоиллюминации (ЭИ) также связана с переходом к малым доступам хирургии (25 G, 27 G, 29 G), однако усиление мощности светового потока, сопровождающего этот

переход, неизбежно повышает риск фототоксического повреждения сетчатки и пигментного эпителия [4, 5].

Выделяют следующие основные параметры, влияющие на фототоксичность эндовитреальных источников освещения: тип осветителя, показатель афакической опасности, яркость освещения, числовая апертура волокна (конус освещения), продолжительность светового воздействия, рабочее расстояние (между эндосветителем

и сетчаткой) и зона сетчатки, на которую воздействует световой поток [2, 3].

Благодаря многолетним экспериментальным исследованиям были раскрыты ключевые патогенетические звенья фотоповреждения структур и тканей глаза. За счет большой концентрации в фоторецепторах фотосенсибилизаторов, высокого парциального давления кислорода в сетчатке и содержания полиненасыщенных жирных кислот деструктивные фотохимические реакции могут развиваться в результате усиления оксидативных процессов [6–12]. Показано, что в клетках ретинального пигментного эпителия содержатся липофусциновые гранулы, содержащие бисретиноиды-флуорофоры, которые при воздействии света начинают вырабатывать активные формы кислорода, приводящие в дальнейшем к образованию окисленных продуктов [13].

В первую очередь, фотосенсибилизаторы, такие как ретиналь и его метаболиты, представляют потенциальную фототоксическую опасность. Под воздействием света они способны генерировать синглетный кислород и супероксидные радикалы [14]. К другим патогенетическим факторам относится высокое напряжение кислорода, которое на уровне верхушек наружных сегментов фоторецепторов достигает 100 мм рт. ст. И, наконец, следует отметить, что окислительная деструкция меланосом может приводить к образованию токсичных альдегидов и кетонов, а также модификации белков [15].

Таким образом, согласно данным публикаций, в ходе витреоретинальных вмешательств возникают все потенциально опасные условия для фотоповреждения тканей и структур глаза, особенно комплекса фоторецептор – пигментный эпителий.

Целью работы было оценить влияние эндоиллюминации различной интенсивности и продолжительности на изменение оксидативных процессов в крови кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 16 кроликах (самцах), возрастом от 6 до 9 месяцев и весом 2–3 кг на кафедре офтальмологии и в Центральной научно-исследовательской лаборатории Башкирского государственного медицинского университета. Животные были приобретены в специализированном питомнике (ИП Тулупов; Россия). Кролики находились в контролируемых условиях, обеспечивающих оптимальную температуру, влажность и освещенность, и получали сбалансированный рацион, включающий специализированные корма и свежую воду. За полчаса до операции животным внутримышечно вводили 2%-й раствор ксилазина (Alfasan International B.V.; Нидерланды) в дозировке 1 мг на 1 кг массы тела, чтобы обеспечить выраженный седативный эффект. Для общей анестезии внутримышечно использовали «Золетил 100» (Вирбак, Франция) в дозе 7,5 мг на 1 кг массы тела кроликов. Для расширения зрачка за 15–20 мин до процедуры в конъюнктивальный мешок инстиллировали капли «Мидримакс» (Sentiss Pharma; Индия). Местную анестезию проводили с использованием 0,5%-го раствора проксиметакаина гидрохлорида.

В качестве образцов для исследования отбирали кровь из ушной вены (УВ) кролика. Такой подход обусловлен тем, что ранее, на пилотном этапе исследования, мы производили отбор образцов из центральной вены сетчатки (ЦВС) канюлей MedOne диаметром 27–40 G. Однако непосредственный забор крови из ЦВС в наших

экспериментах имел серьезные методические ограничения, поскольку при этом происходит дополнительное нарушение внутриглазных сред. Анализ параметров биофлуоресценции (БХЛ), произведенный на образцах из ЦВС и УВ кролика, статистически значимых различий не выявил, что позволило использовать в качестве образцов для анализа именно кровь из УВ.

Для моделирования эндоитреального воздействия использовали порт 25 G, установленный в проекции плоской части цилиарного тела. В качестве осветителя применяли ксеноновый источник, интегрированный в офтальмологическую микрохирургическую систему «Оптимед Профи» (ЗАО «Оптимедсервис»; Россия). Эндоосветитель вводили через порт, при этом его кончик располагали на расстоянии 8 мм (консус освещения 30°) от сетчатки в направлении макулярной зоны.

Экспериментальные животные были разделены на две группы.

Группа 1: воздействие света с 8 кд/м² (50%) в течение 30 мин (4 кролика, 4 глаза) и 60 мин (4 кролика, 4 глаза).

Группа 2: воздействие света с 16 кд/м² (100%) в течение 30 мин (4 кролика, 4 глаза) и 60 мин (4 кролика, 4 глаза).

По завершении световой экспозиции проводили повторный отбор крови из ушной вены.

Для оценки влияния эндоиллюминации при витректомии на оксидативные процессы использовали метод регистрации БХЛ. В основе применения БХЛ в витреоретинальной хирургии для оценки фотоповреждений тканей глаза лежит то, что хемилюминесценция отражает излучение света от электронно-возбужденных состояний атомов и молекул, возникающих при химических реакциях. При этом свободнорадикальные процессы являются единственными источниками биофлуоресценции [16].

БХЛ крови регистрировали на приборе «ХЛМ-003» (Уфимский государственный авиационный технический университет, Россия), измеряя светосумму *S* и максимальную амплитуду медленной вспышки *I*_{max} в единицах квант/с в течение 3 мин [17]. БХЛ цельной крови использовали как индикатор уровня оксидативных процессов генерации активных форм кислорода клетками крови, в первую очередь нейтрофилами. Для регистрации люминол-зависимой биофлуоресценции (ЛЗБХЛ) использовали люминол (10⁻⁴ M) в растворе на основе диметилсульфоксида (DMSO). 0,1 мл крови смешивали с 2 мл раствора люминола, после чего смесь помещали в камеру прибора при 37 °С. Кроме ЛЗБХЛ исследовали железоиндуцированную биофлуоресценцию (ЖБХЛ) сыворотки крови, чтобы определить уровень оксидативных процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Для получения сыворотки кровь центрифугировали, затем разводили сыворотку фосфатным буфером. Свечение индуцировали добавлением раствора FeSO₄ × 7H₂O, интенсивность которого отражает уровень ПОЛ.

Данные анализировали с использованием непараметрического *U*-теста Манна–Уитни. Результаты считали достоверными при *p* ≤ 0,05 и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного интервала (IQR).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После 30-минутной экспозиции световых источников с интенсивностью 50% (8 кд/м²; группа 1) наблюдалось значительное увеличение уровня биофлуоресценции с люминолом. В ходе эксперимента значение ЛЗБХЛ возросло с исходного уровня 26,4 × 10⁵ квант/с до

Таблица 1. Параметры ЛЗБХЛ (Ме (IQR)) до и после 30- и 60-минутного воздействия афакичным светом разной интенсивности, 10^5 квант/с

Исследуемый параметр	До воздействия	30 мин		60 мин	
		50%-я интенсивность ЭИ	100%-я интенсивность ЭИ	50%-я интенсивность ЭИ	100%-я интенсивность ЭИ
S	26,4 (21,4–29,2)	38,2 (36,5–39,0)*	62,2 (61,4–64,7)*	79,1 (78,8–79,6)*	179,5 (179,5–180,6)*
Imax	7,6(7,4–8,8)	12,7 (11,2–14,3)*	17,1 (16,1–17,9)*	25,06 (24,9–25,5)*	53,3 (52,5–53,5)*

Примечание: * — различие с контролем статистически значимо при $p \leq 0,05$.

$38,2 \times 10^5$ квант/с. Это увеличение соответствует росту интенсивности почти на 50%, что свидетельствует о заметном влиянии излучения умеренной интенсивности на данный показатель. При воздействии излучением с увеличенной интенсивностью 100% (16 кд/м^2 ; группа 2), уровень ЛЗБХЛ показал еще более выраженное усиление, достигнув значения $62,2 \times 10^5$ квант/с. Такое увеличение эквивалентно росту интенсивности почти в 2,5 раза по сравнению с исходным значением. Полученные данные показывают, что более интенсивное излучение оказывает более сильное влияние на уровень ЛЗБХЛ. Это подтверждает зависимость эффекта от интенсивности применяемого излучения. Для оценки более продолжительной ЭИ мы провели соответствующие измерения ЛЗБХЛ и при 60-минутной экспозиции. Данные представлены в табл. 1.

Согласно данным таблицы, ЭИ приводит к усилению ЛЗБХЛ, что отражает увеличение генерации свободных радикалов клетками крови. Увеличение времени экспозиции вызывает усиление параметров ЛЗБХЛ, что свидетельствует об интенсификации окислительных процессов в крови. После длительности воздействия в 60 мин значение ЛЗБХЛ увеличилось в 3 раза: значение контроля составляло $26,4 \times 10^5$ квант/с, а значение после излучения — $79,1 \times 10^5$ квант/с. Почти в 7 раз вырос показатель ЛЗБХЛ при увеличении интенсивности до 100% (16 кд/м^2).

При регистрации ЖБХЛ образцов, подвергнутых действию ЭИ, были выявлены следующие закономерности: получасовая экспозиция источников ЭИ вызывала значительное снижение параметров ЖБХЛ: в первой группе в 1,2 раза в сравнении с контролем. Увеличение интенсивности до полного значения в 100% (16 кд/м^2 ; группа 2) приводило к двукратному снижению параметров светимости. Контроль — $408,2 \times 10^5$ квант/с, после воздействия — $206,1 \times 10^5$ квант/с.

При увеличении длительности воздействия до 60 мин снижение параметров ЖБХЛ стало еще более заметным. При 50-процентной интенсивности (8 кд/м^2 ; группа 1) ЖБХЛ снижался до $204,0 \times 10^5$ квант/с, что меньше в 2 раза. При 100-процентной интенсивности (16 кд/м^2 ; группа 2) ЖБХЛ упала до значения $137,1 \times 10^5$ квант/с, что меньше в 3 раза. Эти результаты демонстрируют значительное

влияние длительности и интенсивности излучения на биохимиллюминесценцию сыворотки крови (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты нашего исследования показали, что изменения окислительных процессов в крови имеют явный дозозависимый характер, обусловливаемый интенсивностью и длительностью эндоиллюминации. При увеличении интенсивности и длительности ЭИ было отмечено усиление ЛЗБХЛ исследуемых образцов, что свидетельствует об усилении окислительных процессов в клетках крови. Очевидно, первоначально активируются кислород-зависимые механизмы клеток, реализующие генерацию активных форм кислорода.

Полученные результаты соответствуют общим выводам о том, что под действием света запускаются окислительные процессы в молекулярных структурах глаза, которые приводят к образованию продуктов окислительной деградации [13, 18].

Выявленные пониженные показатели ЖБХЛ отражают повышение антиоксидантной активности и снижение уровня липопероксидации. Это может быть связано с тем, что усиление окислительных процессов вызывает активацию антиоксидантных ферментных систем. В отдельных исследованиях показано, что ингибирующее действие в отношении продуктов окислительной фотодеструкции связано с антиоксидантной активностью [19]. Увеличение антиоксидантной активности в сыворотке крови, вероятно, можно объяснить компенсаторной перестройкой антиоксидантных систем, вызванной накоплением свободных радикалов вследствие эндоиллюминации. Этот процесс можно рассматривать как адаптивный механизм, позволяющий организму нейтрализовать избыток свободных радикалов и поддерживать клеточный гомеостаз.

Таким образом, последствия воздействия ЭИ приводят к сложному адаптивному ответу системы крови, который направлен на уменьшение повреждения от свободнорадикального окисления и поддержание жизнеспособности клеток. В исследованиях по механизмам светового повреждения глаза показано, что продукты окислительной деградации способны диффундировать в цитоплазму клеток и вызывать токсические эффекты

Таблица 2. Параметры ЖБХЛ (Ме (IQR)) до и после 30- и 60-минутного воздействия афакичным светом разной интенсивности, 10^5 квант/с

Исследуемый параметр	До воздействия	30 мин		60 мин	
		50%-я интенсивность ЭИ	100%-я интенсивность ЭИ	50%-я интенсивность ЭИ	100%-я интенсивность ЭИ
S	408,2 (379,2–416,6)	333,5 (327,2–335,8)*	206,0 (188,7–220,8)*	204,0 (197,9–209,8)*	137,1 (136,4–138,7)*
Imax	205,3 (197,9–213,7)	170,9 (169,3–172,1)*	127,5 (117,3–135,2)*	102,1 (102,0–112,20)*	68,1 (66,8–74,2)*

Примечание: * — различие с контролем статистически значимо при $p \leq 0,05$.

уже тогда, когда отсутствует действие света [13]. Время и интенсивность ЭИ, как показало настоящее исследование, выступают важным фактором в изменении параметров ЛЗБХЛ и ЖБХЛ. Чем длительнее и интенсивнее ЭИ, тем сильнее изменения в виде увеличения ЛЗБХЛ и снижения ЖБХЛ.

ВЫВОДЫ

На основании представленных данных, можно заключить, что продолжительность и интенсивность

светового воздействия от источников эндоиллюминации приводят к значительным изменениям в окислительных процессах крови. Наиболее выраженные изменения в окислительных процессах выявлены после 60-минутного воздействия 100%-й интенсивности эндоиллюминации. Дальнейшие морфологические и электрофизиологические исследования помогут определить вклад и временной характер обнаруженных изменений окислительных процессов в развитие фототоксических рисков источников эндоиллюминации.

Литература

1. Казиев С. Н., Борзенко С. А., Сабурова И. Н., Кошелева Н. В., Тонаева Х. Д. Эндоиллюминация в ходе витреальной хирургии — эволюция вопроса и особенности применения на современном этапе. *Практическая медицина*. 2013; 70: 10–2.
2. de Oliveira PR, Berger AR, Chow DR. Vitreoretinal instruments: vitrectomy cutters, endoillumination and wide-angle viewing systems. *Int J Retina Vitreous*. 2016; 2: 28.
3. McCannel CA. Advanced in endoillumination. *Retinal Physician*. 2015; 12: 9–10.
4. Totsuka K, Ueta T, Uchida T, Roggia MF, Nakagawa S, Vavvas DG, et al. *Exp Eye Res*. 2019; 181: 316–24.
5. Sun Y, Zheng Y, Wang C, Liu Y. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis*. 2018; 9 (7): 753.
6. Tang Z, Ju Y, Dai X, Ni N, Liu Y, Zhang D, et al. HO-1-mediated ferroptosis as a target for protection against retinal pigment epithelium degeneration. *Redox Biol*. 2021; (43): 101971.
7. Upadhyay M, Milliner C, Bell BA, Bonilha VL. Oxidative stress in the retina and retinal pigment epithelium (RPE): Role of aging, and DJ-1. *Redox Biol*. 2020; 37: 101623.
8. Rossino MG, Lulli M, Amato R, Cammalleri M, Monte MD et al. Oxidative Stress Induces a VEGF Autocrine Loop in the Retina: Relevance for Diabetic Retinopathy. *Cells*. 2020; 9 (6): 1452.
9. Wang S, Ji LY, Li L, Li JM. Oxidative stress, autophagy and pyroptosis in the neovascularization of oxygen-induced retinopathy in mice. *Mol Med Rep*. 2019; 19 (2): 927–34.
10. Ozawa Y. Oxidative stress in the light-exposed retina and its implication in age-related macular degeneration. *Redox Biol*. 2020; 37: 101779.
11. Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res*. 2017; 60: 201–18.
12. Guo KX, Huang C, Wang W, Zhang P, Li Y, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction of retinal ganglion cells injury exposures in long-term blue light. *Int J Ophthalmol*. 2020; 13 (12): 1854–63. <https://doi.org/10.18240/ijo.2020.12.03>.
13. Яковлева М. А., Островский Д. С., Хубецова М. Х., Борзенко С. А., Фельдман Т. Б., Островский М. А. Изучение цитотоксических свойств неокисленных и окисленных бисретиноидов липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023; 67 (3): 76–87.
14. Журавлев А. И. Квантовая биофизика животных и человека: учебное пособие. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2015.
15. Gulina AA, Dontsov AE, Yakovleva MA, Trofimova NN, Aybush AV et al. Oxidative destruction of human RPE melanosomes induced by superoxide radicals leads to the formation of reactive aldehydes and ketones. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics*. 2022; 15 (3.2): 311–6.
16. Закотеев Ю. А. Хемилюминесценция. Принципы и методики регистрации, оборудование, задачи. М., 2015.
17. Фархутдинов Р. Р., Тевдорадзе С. И. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминомере ХЛ-003. Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ. М.: РУДН, 2005.
18. Dontsov AE, Yakovleva MA, Vasin AA, Gulina AA, Aybush AV, et al. Understanding the mechanism of light-induced age-related decrease in melanin concentration in retinal pigment epithelium cells. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (17): 13099.
19. Донцов А. Е., Аронштам Н. Л., Островский М. А. Ингибирующее действие оксибиола на процесс модификации белков водорастворимыми продуктами фотоокислительной деградации бисретиноида А2Е. *Биофизика*. 2024; 69 (2): 257–63.

References

1. Kaziev SN, Borzenok SA, Saburina IN, Kosheleva NV, Tonaeva HD. Jendoilluminacija v hode vitreal'noj hirurgii — jevolucija voprosa i osobennosti primenenija na sovremennom jetape. *Prakticheskaja medicina*. 2013; 70: 10–2. Russian.
2. de Oliveira PR, Berger AR, Chow DR. Vitreoretinal instruments: vitrectomy cutters, endoillumination and wide-angle viewing systems. *Int J Retina Vitreous*. 2016; 2: 28.
3. McCannel CA. Advanced in endoillumination. *Retinal Physician*. 2015; 12: 9–10.
4. Totsuka K, Ueta T, Uchida T, Roggia MF, Nakagawa S, Vavvas DG, et al. *Exp Eye Res*. 2019; 181: 316–24.
5. Sun Y, Zheng Y, Wang C, Liu Y. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis*. 2018; 9 (7): 753.
6. Tang Z, Ju Y, Dai X, Ni N, Liu Y, Zhang D, et al. HO-1-mediated ferroptosis as a target for protection against retinal pigment epithelium degeneration. *Redox Biol*. 2021; (43): 101971.
7. Upadhyay M, Milliner C, Bell BA, Bonilha VL. Oxidative stress in the retina and retinal pigment epithelium (RPE): Role of aging, and DJ-1. *Redox Biol*. 2020; 37: 101623.
8. Rossino MG, Lulli M, Amato R, Cammalleri M, Monte MD et al. Oxidative Stress Induces a VEGF Autocrine Loop in the Retina: Relevance for Diabetic Retinopathy. *Cells*. 2020; 9 (6): 1452.
9. Wang S, Ji LY, Li L, Li JM. Oxidative stress, autophagy and pyroptosis in the neovascularization of oxygen-induced retinopathy in mice. *Mol Med Rep*. 2019; 19 (2): 927–34.
10. Ozawa Y. Oxidative stress in the light-exposed retina and its implication in age-related macular degeneration. *Redox Biol*. 2020; 37: 101779.
11. Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res*. 2017; 60: 201–18.
12. Guo KX, Huang C, Wang W, Zhang P, Li Y, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction of retinal ganglion cells injury exposures in long-term blue light. *Int J Ophthalmol*. 2020; 13 (12): 1854–63. <https://doi.org/10.18240/ijo.2020.12.03>.
13. Yakovleva MA, Ostrovsky DS, Khubetsova MH, Borzenok SA, Feldman TB, Ostrovsky MA. Study of the cytotoxic properties of unoxidized and oxidized bisretinoids of lipofuscin granules in retinal pigment epithelium cells. *Pathological Physiology and*

- Experimental Therapy. 2023; 67 (3): 76–87. Russian.
14. Zhuravlev AI. Kvantovaja biofizika zhivotnyh i cheloveka: uchebnoe posobie. M.: Izd-vo «BINOM. Laboratorija znaniy», 2015. Russian.
 15. Gulin AA, Dontsov AE, Yakovleva MA, Trofimova NN, Aybush AV et al. Oxidative destruction of human RPE melanosomes induced by superoxide radicals leads to the formation of reactive aldehydes and ketones. St. Petersburg State Polytechnical University Journal. Physics and Mathematics. 2022; 15 (3.2): 311–6.
 16. Zakotееv JuA. Hemiljuminescencija Principy i metodiki registracii, oborudovanie, zadachi. M., 2015. Russian.
 17. Farhutdinov RR., Tevdoradze SI. Metodiki issledovaniya hemiljuminescencii biologicheskogo materiala na hemiljumomere HL-003. Metody ocenki antioksidantnoj aktivnosti biologicheski aktivnyh veshhestv. M.: RUDN, 2005. Russian.
 18. Dontsov AE, Yakovleva MA, Vasin AA, Gulin AA, Aybush AV, et al. Understanding the mechanism of light-induced age-related decrease in melanin concentration in retinal pigment epithelium cells. Int J Mol Sci. 2023; 24 (17): 13099.
 19. Dontsov AE, Aronstam NL, Ostrovsky MA. Inhibitory effect of oxybiol on the modification of proteins by water-soluble products of photooxidative destruction of bisretinoid A2E. Biophysics. 2024; 69 (2): 257–63. Russian.

ШТАММЫ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С МУТАЦИЯМИ В *gyrA* РАЗЛИЧАЮТСЯ ПО УРОВНЮ КОНКУРЕНТНОГО ФИТНЕСА

С. Н. Андреевская¹✉, Т. Г. Смирнова¹, Л. Н. Черноусова¹, Е. Е. Ларионова¹, Э. В. Севастьянова¹, В. В. Устинова¹, Е. А. Киселева¹, А. Эргешов^{1,2}

¹ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

² Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия

В процессе формирования устойчивости *M. tuberculosis* к фторхинолонам в организме хозяина могут одновременно сосуществовать пулы *M. tuberculosis*, чувствительные к препаратам этой группы, и пулы *M. tuberculosis* с различными детерминантами устойчивости. Целью исследования было изучить особенности роста *in vitro* штаммов *M. tuberculosis*, отличающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам, в условиях конкуренции за питательные вещества. Исследование проведено на пяти клинических штаммах *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, различающихся структурой *gyrA*. Штаммы культивировали попарно и индивидуально в оптимальных условиях (среда Middlebrook 7H9) и в условиях мультистресса (50% среда Middlebrook 7H9, 2 мМ KNO₂, 0,02% H₂O₂). Время эксперимента составило 21 сутки. Число клеток каждого из совместно культивируемых штаммов оценивали по калибровочным кривым зависимости порогового цикла полимеразной цепной реакции по целевому для мутации каналу от концентрации клеток *M. tuberculosis*. По числу клеток каждого штамма при совместном культивировании вычисляли величину конкурентного фитнеса и удельную скорость роста. Было установлено, что штаммы *M. tuberculosis* с мутациями в *gyrA* уступали в скорости роста штамму с диким типом *gyrA*, что было особенно сильно выражено в условиях мультистресса. Штамм с наиболее распространенной мутацией *gyrA*_D94G имел наименьшую скорость роста из всех исследованных штаммов. Была высказана гипотеза, что медленный рост *M. tuberculosis* с этой мутацией может приводить к толерантности к противотуберкулезным препаратам и в результате этого штамм получает преимущество в условиях химиотерапии по сравнению с другими мутантными по *gyrA* вариантами.

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, фторхинолоны, конкурентный фитнес, устойчивость, гетерорезистентность

Финансирование: исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ "ЦНИИТ" № НИОКТР 122041100246-3 «Межвидовой и внутривидовой полиморфизм микобактерий у больных туберкулезом и микобактериозом на фоне специфической терапии».

Вклад авторов: Л. Н. Черноусова, А. Эргешов — разработка дизайна исследования; В. В. Устинова, Е. А. Киселева — проведение эксперимента; Т. Г. Смирнова — проведение эксперимента, анализ полученных данных; Е. Е. Ларионова — анализ полученных данных; Э. В. Севастьянова — обзор публикаций по теме исследования; С. Н. Андреевская — анализ полученных данных, написание рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Софья Николаевна Андреевская
Яузская аллея, д. 2 стр. 1А, г. Москва, 107564, Россия; andsofia@mail.ru

Статья получена: 05.11.2024 **Статья принята к печати:** 29.11.2024 **Опубликована онлайн:** 19.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.058

STRAINS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* WITH MUTATIONS IN *gyrA* DIFFER IN THEIR LEVEL OF COMPETITIVE FITNESS

Andreevskaya SN¹✉, Smirnova TG¹, Chernousova LN¹, Larionova EE¹, Sevastyanova EV¹, Ustinova VV¹, Kiselyova EA¹, Ergeshov A^{1,2}

¹ Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

² Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

As *M. tuberculosis* strains develop resistance to fluoroquinolones, pools of *M. tuberculosis* sensitive to drugs of this group and pools of *M. tuberculosis* with different resistance determinants can simultaneously coexist in the host organism. The goal of this research was to run an *in vitro* investigation of growth characteristics of *M. tuberculosis* strains which have different genetic determinants of resistance to fluoroquinolones, in the setting of competition for nutrients. The research used five clinical strains of multidrug-resistant *M. tuberculosis* differing in *gyrA* structure. Strains were cultured in pairs and individually under optimal conditions (Middlebrook 7H9 medium) and under conditions of multistress (50% Middlebrook 7H9 medium, 2 mM KNO₂, 0.02% H₂O₂). The experiment took 21 days. The number of cells of each co-cultured strain was estimated from calibration curves. These curves showed the dependence of the threshold cycle of the polymerase chain reaction — respective to the channel targeted by the mutation — on the concentration of *M. tuberculosis* cells. The competitive fitness value and specific growth rate were calculated from the number of cells of each strain when co-cultured. *M. tuberculosis* strains with mutations in *gyrA* were found to be inferior in growth rate to the wild-type *gyrA* strain, which was particularly pronounced under multistress conditions. The strain with the most common *gyrA*_D94G mutation had the lowest growth rate of all strains examined. It has been hypothesised that the slow growth of *M. tuberculosis* with this mutation may lead to tolerance to anti-tuberculosis drugs, and as a result, the strain gains an advantage under chemotherapy conditions compared to other *gyrA* mutant variants.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, *gyrA*, fluoroquinolones, competitive fitness, resistance, heteroresistance

Funding: the study was conducted under the State assignment of FGBNU 'CNIIIT' No. NIOCTR 122041100246-3 'Interspecies and intraspecies polymorphism of mycobacteria in patients with tuberculosis and mycobacteriosis in the presence of specific therapy'.

Author contribution: Chernousova LN, Ergeshov A — development of the research design; Ustinova VV, Kiseleva EA — conducting the experiment; Smirnova TG — conducting the experiment, analyzing the obtained data; Larionova EE — analyzing the obtained data; Sevastyanova EV — review of publications on the topic of the research; Andreevskaya SN — analyzing the obtained data, writing the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sophia Nikolayevna Andreevskaya
Yauzskaya Alley, 2 p. 1A, Moscow, 107564, Russia; andsofia@mail.ru

Received: 05.11.2024 **Accepted:** 29.11.2024 **Published online:** 19.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.058

Микобактерии туберкулезного комплекса — генетически гомогенная группа бактерий с низкой, по сравнению с другими бактериями, частотой мутагенеза [1]. Несмотря на то что частота возникновения мутаций у *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) низкая, необходимо учитывать, что заболевание туберкулезом длится от нескольких месяцев до нескольких лет и размер бактериальной популяции в организме хозяина в это время может достигать более 1 млрд КОЕ, повышается вероятность возникновения спонтанных мутаций, в том числе в генах, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, вследствие чего могут появляться клоны с новыми генотипами [2, 3].

Существование лекарственно-чувствительных и лекарственно-устойчивых пулов МБТ в одном организме называют бактериальной гетерорезистентностью [4, 5]. Состояние гетерорезистентности может возникать не только в случае микроэволюции одного клона, как описано выше (моноклональная гетерорезистентность), но и в результате смешанной инфекции, когда человек инфицирован несколькими штаммами МБТ с разной лекарственной устойчивостью (поликлональная гетерорезистентность) [6–8]. Моноклональная гетерорезистентность считается одним из основных этапов развития лекарственной устойчивости у бактериальных изолятов [5, 9]. В ряде исследований была установлена связь между наличием гетерорезистентности и неудачей лечения туберкулеза [10, 11].

В настоящее время во всем мире отмечается рост туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ ТБ), когда возбудитель устойчив одновременно к двум основным препаратам первого ряда — рифампицину и изониазиду [12]. Наиболее эффективны для терапии МЛУ ТБ препараты группы фторхинолонов [13–15]. По данным разных авторов, частота гетерорезистентности МБТ к фторхинолонам колеблется в зависимости от изучаемого региона от 1 до 35% [16–20].

Описанные выше предпосылки: формирование лекарственной устойчивости через этап гетерорезистентности, неудачи терапии туберкулеза при наличии гетерорезистентности возбудителя, важность фторхинолонов как наиболее эффективных препаратов при МЛУ ТБ, делают актуальными исследования, направленные на понимание механизмов гетерорезистентности МБТ к фторхинолонам, а также эволюционных перспектив МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к препаратам этой группы.

Цель исследования — изучить особенности роста *in vitro* штаммов МБТ, различающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам, в условиях конкуренции за питательные вещества.

Таблица 1. Характеристика штаммов МБТ

Код штамма	Фенотипическая устойчивость	Мутации в генах			SIT
		<i>rpoB</i>	<i>katG</i>	<i>gyrA</i>	
90V	HREZEthLfx	S531L	S315T	A90V	SIT1
94Y	HREZLfx	S531L	S315T	D94Y	SIT1
94G	HREZEthLfx	S531L	S315T	D94G	SIT1
94A	HREZEthLfx	S531L	S315T	D94A	SIT1
WT	HREZEth	S531L	S315T	WT	SIT1

Примечание: код штамма присвоен по мутации в гене *gyrA* (кодон и аминокислотная замена); WT — штамм МБТ с диким типом *gyrA*; H — изониазид; R — рифампицин; E — этамбутол; Z — пипразинамид; Eth — этионамид; Lfx — левофлоксацин; SIT (Spoligotype International Type) — международный код сполиготипа по номенклатуре базы данных SITVIT2 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT2/>).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Исследование проводили на пяти клинических штаммах МБТ, максимально сходных по фенотипической устойчивости, имеющих идентичный МЛУ-генотип (*rpoB*_S531L + *katG*_S315T) и относящихся к сполиговарианту SIT1 Пекинской сублинии, но различающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам (четыре штамма с различными мутациями в гене *gyrA* и один штамм с *gyrA* дикого типа; табл. 1).

Культивирование штаммов МБТ

Штаммы МБТ культивировали попарно и индивидуально на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 и в условиях мультистресса (50% среда Middlebrook 7H9, 2мМ KNO₂, 0,02% H₂O₂). Время эксперимента составило 21 сутки.

Определение числа клеток МБТ в образце

Для определения числа клеток каждого штамма в образце применяли подход, использующий результаты мультиплексной ПЦР с использованием набора «Амплитуб-FQ-PB» («Синтол», Россия), который выявляет основные мутации, ассоциированные с устойчивостью к фторхинолонам. Для этого были приготовлены серийные разведения каждого из штаммов МБТ от 10² до 10⁸ КОЕ/мл и построены калибровочные кривые зависимости порогового цикла амплификации по целевому для мутации каналу от концентрации клеток МБТ в образце. Согласно калибровочным кривым, по значению порогового цикла определяли концентрацию каждого из совместно культивируемых мутантов. Все исследования выполняли в трипликате.

Конкурентный фитнес

Конкурентный фитнес (*W*) штаммов МБТ, отражающий общий прирост культуры каждого штамма за время эксперимента при парном культивировании, определяли по формуле [21]:

$$W = \frac{\ln \frac{S1(f)}{S1(i)}}{\ln \frac{S2(f)}{S2(i)}}$$

где *W* — уровень конкурентного фитнеса;
S1(i) — начальная концентрация штамма 1;
S1(f) — финальная концентрация штамма 1;
S2(i) — начальная концентрация штамма 2;
S2(f) — начальная концентрация штамма 2.

Таблица 2. Конкурентный фитнес (W) штаммов МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к ФХ, определенный на 21 сутки эксперимента

Совместно культивируемые штаммы	Оптимальные условия		Мультистресс	
	W	интерпретация	W	интерпретация
WT + 90V	1,34	WT > 90V	2,07	WT > 90V
WT + 94A	1,32	WT > 94A	1,42	WT > 94A
WT + 94G	1,13	WT > 94G	1,58	WT > 94G
WT + 94Y	0,87	WT < 94Y	1,28	WT > 94Y
94Y + 90V	1,29	94Y > 90V	0,96	94Y < 90V
94Y + 94A	1,16	94Y > 94A	0,86	94Y < 94A
94Y + 94G	1,3	94Y > 94G	1,05	94Y > 94G
94G + 90V	0,93	94G < 90V	0,93	94G < 90V
94G + 94A	0,99	94G = 94A	0,65	94G < 94A
94A + 90V	0,92	94A < 90V	1,01	94A = 90Va
Ранжирование штаммов в порядке возрастания конкурентного фитнеса				
Оптимальные условия		94A, 94G → 90V → WT → 94Y		
Мультистресс		94G → 94Y → 90V, 94A → WT		

Примечание: знаки «меньше» (<) и «больше» (>) указывают на то, какой штамм обладает меньшим/большим фитнесом при совместном культивировании; знак «равно» (=) обозначает, что уровень конкурентного фитнеса пары штаммов сходный

При $W > 1$ конкурентный фитнес штамма 1 больше, чем штамма 2;

При $W < 1$ конкурентный фитнес штамма 1 меньше, чем штамма 2;

При $W = 1$ штаммы 1 и 2 имеют сходный конкурентный фитнес.

Для сравнения роста культуры штаммов МБТ, культивируемых парно, с индивидуальным ростом на среде, определяли удельную скорость роста культуры (μ) — накопление бактериальной массы в единицу времени во время экспоненциальной фазы роста, по формуле [22]:

$$\mu = \frac{\ln 2}{g}$$

где g — время генерации, определяемое как:

$$g = \frac{t_2 - t_1}{n}$$

где t_1 и t_2 — время оценки параметра в процессе экспоненциальной фазы роста; n — число генераций, определяемое как:

$$n = \frac{\log_{10} N_2 - \log_{10} N_1}{\log_{10} 2}$$

где N_1 и N_2 — число КОЕ в моменты времени t_1 и t_2 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень конкурентного фитнеса был определен для 10 пар штаммов МБТ с разными детерминантами устойчивости к фторхинолонам (табл. 2). Было показано, что в условиях конкуренции за питательные вещества при росте в оптимальных условиях штаммы МБТ с *gyrA* дикого типа более интенсивно накапливали биомассу по сравнению со штаммами 90V, 94A и 94G. Штамм 94Y при культивировании в оптимальных условиях обладал наибольшим конкурентным фитнесом из всех исследованных штаммов, включая штамм WT. Наименьший конкурентный фитнес в оптимальных условиях культивирования был у штаммов МБТ 94A и 94G.

В условиях мультистресса на обедненной питательной среде Middlebrook 7H9 в присутствии активных форм кислорода и азота способность исследованных штаммов МБТ конкурировать за питательные вещества

отличалась от оптимальных условий культивирования. При мультистрессе штамм с диким типом *gyrA* был более конкурентоспособен по сравнению со штаммами МБТ с мутациями в *gyrA*. Конкурентный фитнес штамма 94Y в условиях мультистресса резко снизился, а штамма 94A, напротив, улучшился по сравнению с оптимальными условиями культивирования. Конкурентный фитнес штамма 94G в условиях мультистресса, так же как и в оптимальных условиях, был наименьшим среди всех исследованных штаммов.

Удельная скорость роста культуры МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам тоже зависела от условий культивирования (табл. 3). При индивидуальном культивировании в оптимальных условиях штаммы *gyrA* дикого типа и мутанты 94Y и 90V имели сходную удельную скорость роста. Удельная скорость роста мутантов 94G и 94A была более низкой.

При парном культивировании в оптимальных условиях удельная скорость роста штаммов МБТ, как правило, была такой же, как и при индивидуальном культивировании. Более низкое значение удельной скорости роста при парном культивировании, по сравнению с индивидуальным, было отмечено только для штамма WT при совместном культивировании со штаммом 94A и для 94G при культивировании со штаммом WT и со штаммом 94A.

В условиях мультистресса при индивидуальном культивировании удельная скорость роста штаммов МБТ WT и 90V была на том же уровне, что и в оптимальных условиях, а у штамма 94A повышалась. Удельная скорость роста штаммов 94G и 94Y в условиях мультистресса при индивидуальном культивировании была ниже, чем в оптимальных условиях.

При совместном культивировании штаммов в условиях мультистресса удельная скорость роста штаммов WT, 90V, 94A и 94Y практически не отличалась от удельной скорости культивирования в оптимальных условиях, или, в некоторых сочетаниях, была выше. Удельная скорость роста штамма 94G при культивировании с другими штаммами или не менялась, по сравнению с оптимальными условиями, оставаясь на таком же низком уровне, или еще сильнее снижалась по сравнению с оптимальными условиями.

Величины удельной скорости роста штаммов при индивидуальном культивировании и при культивировании

Таблица 3. Удельная скорость роста (μ) штаммов МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к ФХ

Штамм	Совместное культивирование с	μ (час ⁻¹)	
		оптимальные условия	мультистресс
WT	–	0,021	0,024
	94Y	0,021	0,024
	94G	0,021	0,024
	94A	0,018*	0,029**
	90V	0,021	0,022
94Y	–	0,024	0,015
	WT	0,023	0,018**
	94G	0,024	0,017
	94A	0,024	0,015
	90V	0,024	0,019**
94G	–	0,016	0,012
	WT	0,012*	0,008*
	94Y	0,016	0,014**
	94A	0,012*	0,007*
	90V	0,016	0,014**
94A	–	0,017	0,022
	WT	0,016	0,015*
	94Y	0,015	0,026**
	94G	0,017	0,02
	90V	0,015	0,025**
90V	–	0,018	0,016
	WT	0,016	0,019**
	94Y	0,019	0,017
	94G	0,018	0,02**
	94A	0,02	0,02**

Примечание: * — μ ниже, чем при индивидуальном культивировании более чем на 10%; ** — μ выше, чем при индивидуальном культивировании более чем на 10%

в условиях мультистресса, как правило, различались. У штамма 94G при совместном культивировании со штаммами WT и 94A и у штамма 94A при совместном культивировании со штаммом WT удельная скорость была более чем на 10% ниже, чем при индивидуальном культивировании. Но чаще при совместном культивировании штаммов в условиях мультистресса удельная скорость была выше, чем при индивидуальном культивировании (штамм WT при совместном культивировании с 94A; штамм 90V — с WT, 94G и 94A, штамм 94A — с 94Y и 90V; штамм 94G — с 90V и 94Y и штамм 94Y — с 90V и WT).

Было также установлено, что штаммы МБТ с мутациями в *gyrA* различались по способности реплицироваться при совместном культивировании, и этот параметр для большинства штаммов менялся в зависимости от условий культивирования.

Так, в оптимальных условиях штамм МБТ 94Y размножался более интенсивно, чем штаммы 94A и 94G, в то время как в условиях мультистресса лучшие показатели роста в паре продемонстрировал штамм 94A, а интенсивность деления штаммов 94Y и 94G при парном культивировании была идентичной. Аналогичным образом условия культивирования повлияли на уровень конкурентного фитнеса в парах 94G + 90V, 94G + 94A и 94A + 90V. Исключение составила только пара штаммов 94Y + 90V, в которой и в оптимальных условиях, и в условиях мультистресса большая интенсивность роста культуры была у штамма 94Y.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Были изучены характеристики роста культуры пяти штаммов МБТ, отличающихся генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам, при индивидуальном и парном культивировании. Исследованные мутантные по *gyrA* варианты МБТ представлены в популяции с разной частотой: наиболее распространены штаммы с мутацией в *gyrA* D94G (40%), второе место по распространенности — у штаммов с мутацией A90V (20%), далее следуют штаммы с мутацией D94A (15%) и D94Y (5%) [20]. Существуют и другие мутантные по *gyrA* варианты МБТ, но они очень редко выделяются от больных, что не позволило нам включить эти штаммы в исследование.

Гетерорезистентность популяции МБТ в организме хозяина можно рассматривать как частный случай внутривидовой конкуренции, так как имеется конкуренция за ограниченный ресурс между представителями одного вида, имеющего незначительные различия (в нашем случае — разная структура альфа-субъединиц ДНК-гиразы, кодируемых геном *gyrA*). Итогом такой конкуренции может стать исчезновение наименее приспособленного пула МБТ и распространение в популяции наиболее приспособленного пула. Поскольку предстояло изучить конкурентоспособность мутантных вариантов МБТ, одним из оцениваемых нами параметров был конкурентный фитнес штаммов МБТ при совместном культивировании. Традиционно конкурентный фитнес МБТ определяют, культивируя

устойчивый штамм совместно с чувствительным штаммом с последующим пересевом смеси штаммов на среду с противотуберкулезным препаратом, определяя тем самым число КОЕ устойчивого штамма в смеси [23]. Но такой подход не позволяет сравнивать конкурентоспособность двух устойчивых штаммов, поэтому для определения конкурентного фитнеса нами впервые был использован метод мультиплексной ПЦР, позволяющий количественно оценить число КОЕ каждого мутантного варианта в образце. Так как исследование проводили в динамике, а не по конечной точке, примененный нами подход позволил также оценить удельную скорость роста каждого мутанта при совместном культивировании.

Кроме того, мы изучали рост совместно культивируемых штаммов не только в оптимальных условиях, но и в модели мультистресса, которая позволяет *in vitro* частично воссоздать условия, с которыми возбудитель сталкивается в макроорганизме: недостаток питательных веществ и вырабатываемые макрофагами в качестве бактерицидных агентов активные формы азота и кислорода [24].

Нами было показано, что конкурентный фитнес штаммов МБТ с мутациями в *gyrA* ниже, чем у штаммов с диким типом *gyrA*. Исключение при культивировании в оптимальных условиях составил только штамм 94Y с редко встречающейся мутацией, но в условиях, максимально приближенных к естественным, на модели мультистресса, скорость его деления существенно снизилась.

Низкая скорость деления мутантных по *gyrA* штаммов МБТ в целом была предсказуема, так как указанный ген кодирует альфа-субъединицу ДНК-гиразы [25]. Изменение структуры этого фермента вследствие мутаций в *gyrA* может негативно сказаться на процессах репликации и транскрипции ДНК в клетке МБТ и привести к снижению скорости роста возбудителя.

Ассоциацию между частотой встречаемости в популяции мутантных по *gyrA* вариантов МБТ и уровнем конкурентного фитнеса можно проследить на модели культивирования в условиях мультистресса: штамм с часто встречаемой мутацией *gyrA*_A90V имел высокие показатели конкурентного фитнеса, штамм с редкой мутацией *gyrA*_D94Y — низкие. Фитнес штамма с мутацией *gyrA*_D94A в модели мультистресса был сравним со штаммом 90V, однако в популяции встречался реже, возможно вследствие того, что мутация *gyrA*_D94A не строго ассоциирована с устойчивостью к фторхинолонам и, следовательно, пул МБТ, несущих эту мутацию, мог быть элиминирован в процессе химиотерапии [20, 26, 27].

Вызывает удивление, что штамм с наиболее распространенной мутацией *gyrA*_D94G имел наименьший уровень конкурентного фитнеса и наименьшую удельную

скорость роста из всех исследованных штаммов. Однако снижение скорости деления в естественных условиях не всегда является недостатком, особенно под давлением отбора вследствие химиотерапии. Большинство противотуберкулезных препаратов эффективны в отношении активно делящихся МБТ, а медленно делящиеся пулы представляют собой серьезную проблему в плане эффективности химиотерапии [28, 29].

Следовательно, можно предположить, что широкая распространенность устойчивых к фторхинолонам МБТ с мутацией *gyrA*_D94G связана с низкой скоростью деления таких штаммов, что позволяет им избегать воздействия противотуберкулезных препаратов.

При обобщении результатов проведенного исследования представляется, что эволюционный успех наиболее распространенного мутантного по *gyrA* варианта МБТ заключается в толерантности к противотуберкулезным препаратам вследствие медленного роста. Встречающиеся в два раза реже МБТ с мутацией *gyrA*_A90V обладают хорошими ростовыми свойствами и получили свое преимущество за счет этой особенности. Штаммы с мутацией *gyrA*_D94A встречаются еще реже, так как, имея высокий уровень конкурентного фитнеса, не всегда устойчивы к фторхинолонам. МБТ с мутацией *gyrA*_D94Y обладают наименьшим фитнесом в условиях мультистресса и редко встречаются в популяции.

В заключение следует отметить, что в статье приведены данные пилотного исследования на ограниченной группе штаммов, следовательно, полученные выводы можно пока расценивать как предварительные и не делать на этом этапе обобщение на всю популяцию устойчивых к фторхинолонам МБТ. Для подтверждения полученных результатов запланировано полномасштабное исследование на большой выборке штаммов.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования было установлено, что штаммы МБТ с мутациями в *gyrA* различаются по способности адаптироваться к условиям конкуренции за питательные вещества *in vitro*. На уровень конкурентного фитнеса штаммов МБТ с различными генетическими детерминантами устойчивости к фторхинолонам оказывают влияние условия культивирования штаммов. Для большинства штаммов МБТ показана прямая ассоциация между уровнем конкурентного фитнеса в условиях мультистресса и частотой встречаемости в популяции. Мутации в *gyrA* снижают скорость роста МБТ, возможно, это помогает выжить возбудителю в условиях химиотерапии.

Литература

- Eldholm V, Balloux F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol.* 2016; 24 (8): 637–48.
- O'Neill MB, Mortimer TD, Pepperell CS. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* across Evolutionary Scales. *PLoS Pathog.* 2015; 11 (11): e1005257.
- Vargas R, Freschi L, Marin M, Epperson LE, Smith M, Oussenko I, et al. In-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* complex during active disease. *Elife.* 2021; 10: e61805.
- Mclvor A, Koornhof H, Kana BD. Relapse, re-infection and mixed infections in tuberculosis disease. *Pathog Dis.* 2017; 75 (3).
- Ye M, Yuan W, Molaeipour L, Azizian K, Ahmadi A, Kouhsari E. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2021; 20 (1): 73.
- Zetola NM, Shin SS, Tumedji KA, Moeti K, Ncube R, Nicol M et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol.* 2014; 52 (7): 2422–9.
- Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol.* 2019;

- 17 (8): 479–96.
8. Ford C, Yusim K, Ioerger T, Feng S, Chase M, Greene M, et al. *Mycobacterium tuberculosis*–heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012; 92 (3): 194–201.
 9. Chen J, Huang F, Yin X, Gu D. Assessments of Different Methods for Testing Heteroresistance to Rifampicin in Tubercle Bacillus. *J Nanosci Nanotechnol*. 2018; 18 (12): 8414–8.
 10. Chen L, Zhang J, Zhang H. Heteroresistance of *Mycobacterium tuberculosis* Strains May Be Associated More Strongly With Poor Treatment Outcomes Than Within-Host Heterogeneity of *M. tuberculosis* Infection. *J Infect Dis*. 2016; 214 (8): 1286–7.
 11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbiati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
 12. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization, 2023; 75 p.
 13. Huo F, Ma Y, Li S, Xue Y, Shang Y, Dong L, et al. Specific *gyrA* gene mutations correlate with high prevalence of discordant levofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Mol Diagn*. 2020; 22 (9): 1199–204.
 14. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2019; 104 p.
 15. Nahid P, Mase SR, Migliori GB, Sotgiu G, Bothamley GH, Brozek JL, et al. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (10): e93–e142.
 16. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguet C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur Respir J*. 2021; 57 (3): 2002338.
 17. Zhang X, Zhao B, Liu L, Zhu Y, Zhao Y, Jin Q. Subpopulation analysis of heteroresistance to fluoroquinolone in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (4): 1471–4.
 18. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (5): 2032–41.
 19. Baffoe-Bonnie A, Houpt ER, Turner L, Dodge D, Heysell SK. Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a Single Patient. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25 (11): 2120–1.
 20. Андреевская С. Н., Смирнова Т. Г., Черноусова Л. Н., Ларионова Е. Е., Киселева Е. А., Эргешов А. Особенности генотипической резистентности к фторхинолонам у *Mycobacterium tuberculosis*, циркулирующих в Российской Федерации. *Вестник РГМУ*. 2022; (5): 23–31.
 21. Kodio O, Georges Togo AC, Sadio Sarro YD, Fane B, Diallo F, Somboro A, et al. Competitive fitness of *Mycobacterium tuberculosis in vitro*. *Int J Mycobacteriol*. 2019; 8 (3): 287–91.
 22. Алешина Е. С., Дроздова Е. А., Романенко Н. А. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса: учебное пособие. Оренбург: ООО ИПК «Университет», 2017; 191 с.
 23. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJ. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006; 312 (5782): 1944–6.
 24. Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front Immunol*. 2017; 8: 84.
 25. An Q, Lin R, Yang Q, Wang C, Wang D. Evaluation of genetic mutations associated with phenotypic resistance to fluoroquinolones, bedaquiline, and linezolid in clinical *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2023; 34: 214–26.
 26. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59 (5): 866–73.
 27. Casali N, Nikolayevskiy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
 28. Gomez JE, McKinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004; 84 (1–2): 29–44.
 29. Mitchison DA, Coates AR. Predictive in vitro models of the sterilizing activity of anti-tuberculosis drugs. *Curr Pharm Des*. 2004; 10 (26): 3285–95.

References

1. Eldholm V, Balloux F. Antimicrobial Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: The Odd One Out. *Trends Microbiol*. 2016; 24 (8): 637–48.
2. O'Neill MB, Mortimer TD, Pepperell CS. Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* across Evolutionary Scales. *PLoS Pathog*. 2015; 11 (11): e1005257.
3. Vargas R, Freschi L, Marin M, Epperson LE, Smith M, Oussenko I, et al. In-host population dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* complex during active disease. *Elife*. 2021; 10: e61805.
4. Mclvor A, Koornhof H, Kana BD. Relapse, re-infection and mixed infections in tuberculosis disease. *Pathog Dis*. 2017; 75 (3).
5. Ye M, Yuan W, Molaeipour L, Azizian K, Ahmadi A, Kouhsari E. Antibiotic heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021; 20 (1): 73.
6. Zetola NM, Shin SS, Tumedi KA, Moeti K, Ncube R, Nicol M et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (7): 2422–9.
7. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nat Rev Microbiol*. 2019; 17 (8): 479–96.
8. Ford C, Yusim K, Ioerger T, Feng S, Chase M, Greene M, et al. *Mycobacterium tuberculosis*–heterogeneity revealed through whole genome sequencing. *Tuberculosis (Edinb)*. 2012; 92 (3): 194–201.
9. Chen J, Huang F, Yin X, Gu D. Assessments of Different Methods for Testing Heteroresistance to Rifampicin in Tubercle Bacillus. *J Nanosci Nanotechnol*. 2018; 18 (12): 8414–8.
10. Chen L, Zhang J, Zhang H. Heteroresistance of *Mycobacterium tuberculosis* Strains May Be Associated More Strongly With Poor Treatment Outcomes Than Within-Host Heterogeneity of *M. tuberculosis* Infection. *J Infect Dis*. 2016; 214 (8): 1286–7.
11. Rigouts L, Miotto P, Schats M, Lempens P, Cabibbe AM, Galbiati S, et al. Fluoroquinolone heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*: detection by genotypic and phenotypic assays in experimentally mixed populations. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 11760.
12. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization, 2023; 75 p.
13. Huo F, Ma Y, Li S, Xue Y, Shang Y, Dong L, et al. Specific *gyrA* gene mutations correlate with high prevalence of discordant levofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Mol Diagn*. 2020; 22 (9): 1199–204.
14. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment. Geneva: World Health Organization, 2019; 104 p.
15. Nahid P, Mase SR, Migliori GB, Sotgiu G, Bothamley GH, Brozek JL, et al. Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019; 200 (10): e93–e142.
16. Jouet A, Gaudin C, Badalato N, Allix-Béguet C, Duthoy S, Ferré A, et al. Deep amplicon sequencing for culture-free prediction of susceptibility or resistance to 13 anti-tuberculous drugs. *Eur Respir J*. 2021; 57 (3): 2002338.
17. Zhang X, Zhao B, Liu L, Zhu Y, Zhao Y, Jin Q. Subpopulation analysis of heteroresistance to fluoroquinolone in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (4): 1471–4.

18. Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, Dalton TL, Metchock B, Starks AM, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55 (5): 2032–41.
19. Baffoe-Bonnie A, Houghton ER, Turner L, Dodge D, Heysell SK. Drug-Susceptible and Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in a Single Patient. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25 (11): 2120–1.
20. Andreevskaya SN, Smirnova TG, Chemousova LN, Larionova EE, Kiseleva EA, Ergeshov A. The nature of genotypic resistance to fluoroquinolones in *Mycobacterium tuberculosis* circulating in Russian Federation. *Bulletin of RSMU*. 2022; (5): 15–22.
21. Kodio O, Georges Togo AC, Sadio Sarro YD, Fane B, Diallo F, Somboro A. et al. Competitive fitness of *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro*. *Int J Mycobacteriol*. 2019; 8 (3): 287–91.
22. Aleshina ES, Drozdova EA, Romanenko NA. Kul'tivirovanie mikroorganizmov kak osnova biotekhnologicheskogo processa: uchebnoe posobie. Orenburg: OOO IPK «Universitet», 2017; 191 s. Russian.
23. Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJ. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2006; 312 (5782): 1944–6.
24. Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Front Immunol*. 2017; 8: 84.
25. An Q, Lin R, Yang Q, Wang C, Wang D. Evaluation of genetic mutations associated with phenotypic resistance to fluoroquinolones, bedaquiline, and linezolid in clinical *Mycobacterium tuberculosis*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist*. 2023; 34: 214–26.
26. Chan RC, Hui M, Chan EW, Au TK, Chin ML, Yip CK, et al. Genetic and phenotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59 (5): 866–73.
27. Casali N, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Harris SR, Ignatyeva O, Kontsevaya I, et al. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. *Nat Genet*. 2014; 46 (3): 279–86.
28. Gomez JE, McKinney JD. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)*. 2004; 84 (1–2): 29–44.
29. Mitchison DA, Coates AR. Predictive *in vitro* models of the sterilizing activity of anti-tuberculosis drugs. *Curr Pharm Des*. 2004; 10 (26): 3285–95.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ СЕМЕЙСТВ *HERELLEVIIRIDAE* И *ROUNTREEVIRIDAE* НА БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Н. К. Абдраймова[✉], Е. А. Шитиков, М. В. Малахова, Р. Б. Городничев, М. А. Корниенко

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

Staphylococcus aureus вызывает широкий спектр инфекций и часто характеризуется множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Лечение стафилококковых инфекций дополнительно осложнено способностью бактерии формировать биопленку, которая защищает ее от антимикробных агентов и иммунной системы. Одной из перспективных стратегий борьбы с бактериями, обладающими МЛУ и биопленкообразующей активностью, является применение бактериофагов. Целью исследования было оценить влияние литических фагов vB_SauM-515A1 (род *Kayvirus*, семейство *Herelleviridae*) и vB_SauP-436A (род *Rosenblumvirus*, семейство *Rountreeviridae*) на биопленки клинических штаммов *S. aureus*. Исследование включало 20 штаммов восьми сиквенс-типов, из которых 45% (9/20) относились к MRSA, а 35% (7/20) обладали МЛУ. Все штаммы продемонстрировали способность к биопленкообразованию, причем 65% (13/20) являлись сильными продуцентами биопленки. В геномах всех образцов обнаружены гены *icaADBC*-оперона, ответственного за синтез полисахаридного межклеточного адгезина. Воздействие бактериофагов на планктонные клетки бактерий показало, что 70% (14/20) штаммов были чувствительны к фагу vB_SauM-515A1, а 50% (10/20) — к фагу vB_SauP-436A. При этом 24-часовая обработка биопленок чувствительных штаммов фагом vB_SauM-515A1 в 64,3% (9/14) случаев приводила к увеличению биомассы биопленки, тогда как фаг vB_SauP-436A, напротив, достоверно снижал количество биопленки у 40% (4/10) штаммов. Полученные результаты подчеркивают неоднозначность взаимодействия бактериофагов с биопленками *S. aureus* и указывают на необходимость дальнейших исследований для оптимизации фаговой терапии в отношении биопленкообразующих штаммов.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, бактериофаг, фаговая терапия, биопленки, *Herelleviridae*, *Rountreeviridae*, *Kayvirus*, *Rosenblumvirus*

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>

Вклад авторов: Н. К. Абдраймова — план исследования, набор и обработка данных, написание статьи; Е. А. Шитиков, М. А. Корниенко — план исследования, обработка данных, написание статьи; М. В. Малахова — набор и обработка данных; Р. Б. Городничев — план исследования, набор и обработка данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование выполнено с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

✉ **Для корреспонденции:** Нарина Казбековна Абдраймова
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; abdramovanarina@gmail.com

Статья получена: 14.11.2024 **Статья принята к печати:** 30.11.2024 **Опубликована онлайн:** 24.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.061

EFFECTS OF LYTIC BACTERIOPHAGES OF THE FAMILIES *HERELLEVIIRIDAE* AND *ROUNTREEVIRIDAE* ON THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILMS

Abdraimova NK[✉], Shitikov EA, Malakhova MV, Gorodnichev RB, Kornienko MA

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

Staphylococcus aureus causes a broad range of infections and is often characterized by multidrug resistance (MDR). Treatment of staphylococcal infections is further complicated by the ability of bacterium to form biofilms protecting it against antimicrobial agents and the immune system. The use of bacteriophages is one of the promising strategies for combating the bacteria showing MDR and biofilm formation activity. The study aimed to assess the effects of the lytic phages vB_SauM-515A1 (genus *Kayvirus*, family *Herelleviridae*) and vB_SauP-436A (genus *Rosenblumvirus*, family *Rountreeviridae*) on biofilms of the *S. aureus* clinical strains. The study involved 20 strains of eight sequence types, among which 45% (9/20) belonged to MRSA, and 35% (7/20) showed MDR. All the strains demonstrated the ability to form biofilms, and 65% (13/20) were strong biofilm producers. Genes of the *icaADBC* operon responsible for synthesis of polysaccharide intercellular adhesin were found in genomes of all samples. The exposure of planktonic bacterial cells to bacteriophages showed that 70% (14/20) of strains were sensitive to phage vB_SauM-515A1 and 50% (10/20) were sensitive to phage vB_SauP-436A. Furthermore, the 24-h treatment of biofilms of sensitive strains with phage vB_SauM-515A1 led to the biofilm biomass increase in 64.3% (9/14) of cases, while phage vB_SauP-436A, on the contrary, significantly reduced the quantity of biofilm in 40% (4/10) of strains. The results obtained highlight the ambiguity of interaction between bacteriophages and *S. aureus* biofilms and suggest the need for further research aimed at optimizing phage therapy targeting the biofilm-forming strains.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, bacteriophage, phage therapy, biofilm, *Herelleviridae*, *Rountreeviridae*

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>

Author contribution: Abdraimova NK — study plan, data acquisition and processing, manuscript writing; Shitikov EA, Kornienko MA — study plan, data processing, manuscript writing; Malakhova MV — data acquisition and processing; Gorodnichev RB — study plan, data acquisition and processing.

Compliance with ethical standards: the study was compliant with the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working with Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines SP 1.3.2518-09 "Additions and Amendments No. 1 to the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines "Sanitary and Epidemiologic Requirements for the Handling of Medical Waste" (SanPIN 2.1.7.2790-10), as well as Federal Clinical Guidelines "Rational Use of Bacteriophages in Clinical and Epidemiological Practice".

✉ **Correspondence should be addressed:** Narina K. Abdraimova
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; abdramovanarina@gmail.com

Received: 14.11.2024 **Accepted:** 30.11.2024 **Published online:** 24.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.061

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) — один из ведущих бактериальных патогенов, ответственный за широкий спектр инфекций: от поверхностных кожных воспалений до тяжелых, жизнеугрожающих состояний, таких как пневмония, сепсис и эндокардит [1]. Особое внимание к микроорганизму уделяют вследствие его устойчивости к широкому спектру антибиотиков, причем наибольшую значимость имеют метициллин-резистентные штаммы *S. aureus* (MRSA, от англ. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

Лечение стафилококковых инфекций осложнено не только антибиотикорезистентностью, но и обилием факторов вирулентности, один из которых — способность стафилококков образовывать биопленку. Подобно биопленкам других бактерий, биопленка *S. aureus* состоит из двух основных компонентов: воды (около 97%) и органических веществ, представленных внеклеточными полимерами и колониями микроорганизмов. Внеклеточные полимеры составляют 50–90% от всей органической массы биопленки и включают комплекс различных соединений, таких как внеклеточная ДНК (внДНК), белки и полисахариды. Оставшаяся часть биопленки представлена бактериальными клетками [2, 3].

Биопленка обеспечивает прочное прикрепление бактерий к различным поверхностям, включая ткани организма и медицинские изделия [2]. Кроме того, она существенно повышает устойчивость бактерий к факторам иммунной системы и антимикробным препаратам: минимальные ингибирующие концентрации антибиотиков, необходимые для разрушения бактерий в биопленках, могут в 1000 раз превышать концентрации, достаточные для уничтожения планктонных клеток [3, 4].

Бактериофаги все чаще рассматривают как перспективное средство для лечения бактериальных инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами. В медицинской практике применяют исключительно вирулентные бактериофаги, которые реализуют только литический жизненный цикл. К числу таких фагов, способных инфицировать и разрушать клетки *S. aureus*, относятся представители семейств *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*. Они демонстрируют высокую эффективность как в *in vitro* экспериментах, так и в *in vivo* моделях, а также уже успешно применяются в терапии, что обеспечивает снижение бактериальной нагрузки и улучшение клинических исходов [5].

В этом контексте особый интерес вызывают исследования, направленные на оценку действия фагов на биопленку. Показано, что некоторые фаги *S. aureus* могут эффективно снижать количество биомассы биопленки [6, 7]. Тем не менее ряд исследований указывает на возможность стимуляции образования биопленки под воздействием фагов, что может быть связано с особенностями их взаимодействия с бактериальными клетками [8, 9]. Подобные эффекты, вероятно, зависят от ряда факторов: непосредственно от бактериального штамма, используемого бактериофага и их концентраций, от физиологического состояния клеток, а также от морфологических и структурных характеристик самой биопленки.

Цель настоящей работы — исследовать влияние литических бактериофагов vB_SauM-515A1 (семейство *Herelleviridae*) и vB_SauP-436A (семейство *Rountreeviridae*) на биопленки, сформированные клиническими изолятами *S. aureus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и бактериофаги

В работе использовали 20 наиболее различающихся по происхождению и локусу выделения штаммов *S. aureus* из коллекции ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства». Штаммы были собраны в период с 2015 по 2020 г. из стационаров различных регионов России.

Бактериальную культуру выращивали в жидкой среде LB (от англ. lysogeny broth) (Oxoid, Великобритания) или на LB-агаре (Oxoid) в модификации Миллера при 37 °С в течение 18 ч. Клетки, выращенные в жидкой среде, использовали для получения ночных культур, которые затем применяли в качестве инокулята как в экспериментах по определению чувствительности к антибиотикам, так и во всех исследованиях, связанных с оценкой образования биопленок и влиянием на них антибактериальных агентов. Культивирование бактерий на LB-агаре проводили для поддержания бактериальной культуры, а также для подсчета клеток в экспериментах по оценке влияния бактериофагов на сформированные биопленки.

Чувствительность к оксациллину (бета-лактамы антибиотик), ванкомицину (гликопептид), гентамицину (аминогликозид), тетрациклину (тетрациклиновый антибиотик), левофлоксацину (фторхинолон) и эритромицину (макролид) (все препараты производства Sigma-Aldrich, США) определяли методом последовательных разведений в соответствии с рекомендациями EUCAST (v.14.0) [10]. Штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) определяли как устойчивые к трем и более антибиотикам различных классов.

В работе использовали литические бактериофаги vB_SauM-515A1 (род *Kayvirus* семейства *Herelleviridae*) и vB_SauP-436A (род *Rosenblumvirus* семейства *Rountreeviridae*), которые применяли в виде стерильных фильтратов фаголизатов в среде LB. Бактериофаги ранее были выделены из коммерческого комплексного фагового препарата «Бактериофаг стафилококковый» серии P332 («Микроген», Россия) на штаммах *S. aureus* SA515 (ST8 (ST, от англ. sequence type)) и SA436 (ST1) и детально охарактеризованы [11]. Выращивание фагов проводили на соответствующих штаммах-хозяевах.

Молекулярно-генетическая характеристика бактериальных штаммов

Выделение ДНК проводили с использованием набора ДНК-экспресс (Литех, Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Пробы ДНК хранили при –20 °С.

Штаммы типировали методом мультислокусного секвенирования-типирования (МЛСТ) с использованием стандартной схемы [12]. Детекцию генов *icaA*, *icaB*, *icaC* и *icaD*, ответственных за образование биопленки, выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ранее описанных праймеров [13]. Реакционная смесь (25 мкл) для ПЦР содержала 66 мМ Tris-HCl (pH = 9), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 250 мкМ каждого dNTP, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы («Литех», Россия) и по 10 пмоль соответствующих праймеров. Реакцию амплификации выполняли с использованием прибора DNA Engine Tetrad 2 (MJ Research, США) согласно ранее предложенным режимам [13]. Продукты амплификации

анализировали методом горизонтального гель-электрофореза в 2% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием.

Оценка биопленкообразования

Оценку проводили согласно ранее описанной методике [14] с некоторыми модификациями. Для этого суспензию бактериальных клеток в экспоненциальной фазе роста (оптическая плотность (ОП) при 620 нм — 0,12) инокулировали в лунки 96-луночного плоскодонного вентилируемого планшета без покрытия (Thermo Scientific, США), содержащего TSBg (tryptic soy broth с добавлением 1% глюкозы) (HiMedia, Индия) до конечной концентрации 10^4 клеток на лунку и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч без встряхивания. Конечный объем в каждой лунке составил 200 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду. После инкубации лунки трижды аккуратно промывали стерильным фосфатным буфером (PBS, pH = 7,4) для удаления планктонных клеток, затем окрашивали 0,1% водно-спиртовым раствором кристаллического фиолетового (КФ) (Sigma-Aldrich, США) в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации краситель промывали стерильным PBS трижды. Для последующего анализа связанный краситель в каждой лунке элюировали добавлением 200 мкл 96%-го этанола и измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре Microplate Reader Flex-A (Allsheng, China) при 570 нм. Все эксперименты были выполнены в трех биологических повторах.

Определение способности бактерии к биопленкообразованию проводили согласно ранее предложенным критериям: $ОП \leq ОПс$ — штамм не образует биопленку; $ОПс < ОП \leq 2 \times ОПс$ — штамм слабо образует биопленку; $2 \times ОПс < ОП \leq 4 \times ОПс$ — штамм является умеренным продуцентом биопленки; $4 \times ОПс < ОП$ — штамм сильно продуцирует биопленку, где ОПс — средняя ОП отрицательного контроля + $3 \times CO$ (стандартное отклонение). В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду [15].

Чувствительность планктонных форм штаммов к бактериофагам

Чувствительность штаммов к бактериофагам определяли в ходе оценки эффективности посева (EOP, от англ. efficiency of plating), как было описано ранее [11]. EOP представляет собой отношение титра бактериофага на тестируемом штамме к титру бактериофага на штамме-хозяине (*S. aureus* SA515 для фага vB_SauM-515A1; *S. aureus* SA436 для фага vB_SauP-436A), выраженное в процентах. Титр бактериофага на исследуемом штамме определяли методом титрования по Грациа, как описано ранее [16]. Для этого аликвоты (5 мкл) десятикратных последовательных разведений каждого препарата бактериофага (сток 2×10^9 бляшкообразующих единиц/мл, или БОЕ/мл) наносили на поверхность чашек с полужидким LB-агаром (0,6% агара), содержащих 0,1 мл ночной культуры тестируемого штамма (10^6 колониеобразующих единиц/мл, или КОЕ/мл), и инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Концентрацию фаговых частиц в БОЕ/мл оценивали для каждого тестируемого штамма. Оценку эффективности посева проводили в трех повторностях.

Оценка влияния бактериофагов на сформированные биопленки

Для экспериментов использовали 24-часовые биопленки, сформированные и промытые в соответствии с описанным

выше способом. После промывки в лунку добавляли TSBg и фаговый лизат до конечной концентрации 10^8 БОЕ/мл, объем каждой лунки составил 200 мкл. В контрольные образцы вместо фагового лизата вносили стерильный PBS. Инкубацию проводили в течение 24 ч при 37 °С. Далее проводили окрашивание КФ, как описано выше, с последующим измерением ОП при 570 нм. Все эксперименты выполняли в трех биологических повторах.

В предварительных экспериментах определяли количество клеток в биопленке, добавляя 200 мкл стерильного PBS к промытой биопленке и разрушая ее с помощью активного пипетирования. Серийные разведения суспензии клеток высевали на LB-агар. После 24-часовой инкубации при 37 °С подсчитывали количество колоний.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism версии 8.0.1 (GraphPad Software Inc., США) на основании данных *t*-теста. В ходе анализа сравнивали значения оптических плотностей, полученных через 24 ч инкубации биопленок, обработанных и необработанных бактериофагом. Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для подтверждения нормального распределения данных использовали метод Шапиро–Уилка, данные в выборках считали близкими к нормальному распределению при $p > 0,05$.

Для выявления достоверных корреляций по двум номинальным признакам в небольших выборках использовали критерий Фишера. Корреляции считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика штаммов и их способности к биопленкообразованию

Согласно результатам МЛСТ, штаммы коллекции относились к восьми сиквенса-типам, наиболее представленным из которых был ST8 (4/20, 20%) (табл. 1). На ST1, ST121, ST5 и ST25 приходилось по три штамма (по 15%). По чувствительности к антибиотикам значительная часть штаммов относилась к MRSA (9/20, 45%). Кроме того, семь штаммов (35%) характеризовались МЛУ.

Все проанализированные штаммы обладали способностью к биопленкообразованию, причем более половины являлись ее сильными продуцентами (13/20, 65%). В оставшихся случаях (7/20, 35%) штаммы умеренно образовывали биопленку. Подсчет КОЕ показал, что количество клеток в составе 24-часовых биопленок достигает 10^8 КОЕ/мл для всех исследуемых штаммов. Результаты амплификации продемонстрировали, что все изоляты содержали полный набор генов оперона *icaADBC*.

Воздействие бактериофагов различных таксономических групп на планктонные клетки и биопленки *S. aureus*

По результатам оценки действия бактериофагов vB_SauM-515A1 и vB_SauP-436A на планктонные клетки штаммов коллекции было установлено, что 14 (70%) штаммов проявляли чувствительность к фагу vB_SauM-515A1, тогда как к фагу vB_SauP-436A чувствительными были 10 штаммов (50%). Три штамма коллекции (15%) оказались устойчивыми к обоим фагам. Эффективность посева фага vB_SauM-515A1

Таблица 1. Характер пленкообразования штаммов *S. aureus*

Штамм	Происхождение	Локус	ST	Устойчивость к антибиотикам						Тип пленкообразования	EOP (vB_SauM-515A1),%	EOP (vB_SauP-436A),%
				ОКС	ВАНК	ГЕНТ	ТЕТР	ЛЕВОФЛ	ЭРИТ			
SA515	Новосибирск	Раневое отделяемое	8	R	I	R	R	S	S	сильно	100	–
SA64	Санкт-Петербург	Кровь	8	R	S	S	R	R	S	сильно	267	400
SA412	Липецк	Кожа и мягкие ткани	8	R	S	R	I	S	R	сильно	–	150
SA2242	Новосибирск	Кости и суставы	239	R	S	R	S	S	S	сильно	300	–
SA191	Москва	Ликвор	239	R	S	R	R	R	R	сильно	–	–
SA364	Санкт-Петербург	Кожа и мягкие ткани	764	R	S	R	R	n/d	R	сильно	–	–
SA436	Нижний Новгород	Отделяемое из носоглотки	1	R	S	R	R	S	S	умеренно	–	100
SA402	Липецк	Кости и суставы	5	R	S	R	R	R	R	умеренно	183	83
SA88	Краснодар	Раневое отделяемое	25	R	S	S	S	S	S	умеренно	183	167
SA103	Краснодар	Кровь	1	S	S	S	S	S	S	сильно	250	133
SA172	Москва	Раневое отделяемое	1	S	S	S	S	S	S	сильно	–	200
SA2153	Смоленск	Мокрота	5	S	S	S	S	S	R	сильно	250	–
SA2464	Якутск	Кожа и мягкие ткани	5	S	S	S	S	S	S	сильно	190	–
SA54	Иркутск	Отделяемое конъюнктивы	25	S	n/d	S	S	S	S	сильно	500	90
SA2003	Воронеж	Кожа и мягкие ткани	25	S	S	S	S	S	S	сильно	245	–
SA837	Смоленск	Кожа и мягкие ткани	8	S	S	S	S	S	S	сильно	200	–
SA117	Вологда	Отделяемое века	121	S	n/d	S	S	S	S	умеренно	90	75
SA156	Смоленск	Отделяемое конъюнктивы	121	S	n/d	S	S	S	S	умеренно	383	–
Sa226	Москва	Отделяемое века	121	S	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	умеренно	150	200
SA606	Орел	Кожа и мягкие ткани	398	S	S	S	S	S	S	умеренно	–	–

Примечание: «→» — штамм устойчив к бактериофагу; S — штамм чувствителен к антибиотику; R — штамм устойчив к антибиотику; ОКС — оксациллин; ВАНК — ванкомицин; ГЕНТ — гентамицин; ТЕТР — тетрациклин; ЛЕВОФЛ — левофлоксацин; ЭРИТ — эритромицин.

на чувствительных штаммах варьировалась от 90 до 500%, а для фага vB_SauP-436A — от 75 до 400%.

Оценку воздействия бактериофагов на сформированную биопленку проводили только для штаммов, чувствительных к соответствующему бактериофагу по данным экспериментов на планктонных клетках. Обработку биопленок проводили бактериофагом в титре 10^8 БОЕ/мл, что на основании подсчета количества КОЕ в необработанных биопленках соответствует значению множественности инфекции 1 (MOI, от англ. multiplicity of infection).

Согласно результатам экспериментов (рис. 1), в большинстве случаев (9/14, 64,3%) обработка бактериофагом vB_SauM-515A1 в течение 24 ч не вызывала снижения биомассы биопленок, а, наоборот, стимулировала ее образование. Для оставшихся пяти штаммов (5/14, 35,7%) воздействие бактериофага vB_SauM-515A1 не оказывало достоверного влияния на биопленку. Воздействие бактериофага vB_SauP-436A, напротив, достоверно снижало биомассу биопленки для четырех штаммов (4/10, 40%). На биопленки, сформированные остальными штаммами, данный бактериофаг не влиял.

Следует отметить, что по результатам статистического анализа не было выявлено значимых корреляций между принадлежностью штамма к MRSA или какому-либо сиквенс-типу и способностью бактериофагов стимулировать (в случае vB_SauM-515A1) либо разрушать (в случае vB_SauP-436A) биопленку. Эти эффекты также не зависели от исходной способности штаммов к биопленкообразованию.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данного исследования рассматривали штаммы, выделенные из разнородного клинического материала и

относящиеся к эпидемиологически значимым сиквенс-типам (табл. 1). Среди них наибольшую представленность имел ST8 — один из наиболее распространенных сиквенс-типов на территории России и во всем мире среди госпитальных штаммов [17, 18]. Штаммы данного сиквенс-типа включают пандемические клоны, например, USA300, вызывающие многочисленные вспышки инфекции и часто относящиеся к MRSA [19]. Помимо ST8 были выявлены штаммы ST1, ST5 и ST121, которые, согласно литературным данным, характеризуются устойчивостью к антибиотикам и обладают способностью вызывать серьезные инфекции [20–22].

Полученные результаты продемонстрировали способность всех исследуемых образцов, независимо от происхождения и принадлежности к сиквенс-типу, образовывать биопленки. При этом все штаммы характеризовались наличием в геноме *icaADBC*-оперона, ответственного за биосинтез полисахаридного межклеточного адгезина (PIA, от англ. polysaccharide intercellular adhesion) — основного и наиболее изученного компонента матрикса биопленок клинических штаммов *S. aureus* [23, 24]. Следует также отметить, что большинство штаммов оказались сильными продуцентами биопленки. В сочетании с антибиотикорезистентностью это еще раз подчеркивает серьезность проблемы терапии инфекций, вызванных ими.

Для оценки эффективности бактериофагов использовали представителей семейств *Herelleviridae* и *Rountreeviridae*. Выбор фагов был обусловлен их различиями в морфологических (миовирусы и подовирусы), микробиологических (спектр хозяев, параметры инфекции на основании кривой единичного цикла роста) и генетических (размер генома и количество кодируемых генов) характеристиках [11]. Согласно

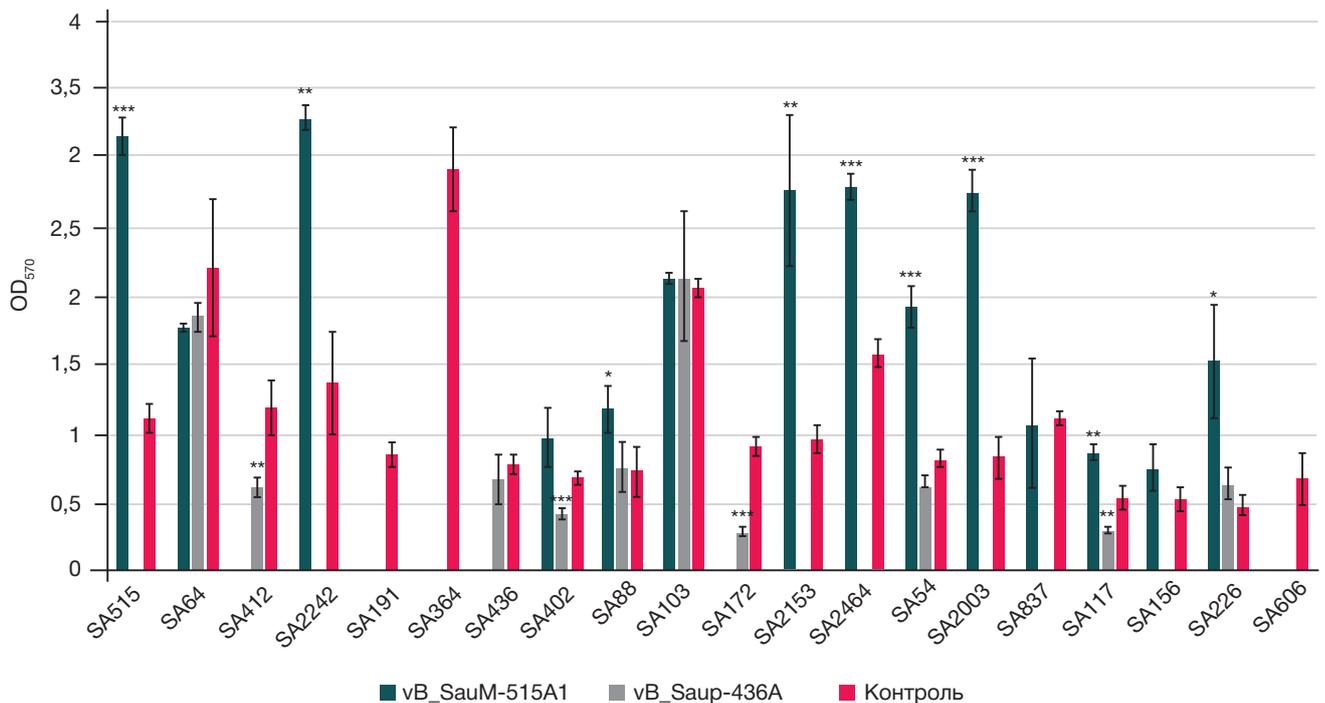


Рис. Результаты воздействия бактериофагов vB_SauM-515A1 и vB_Saup-436A на биомассу биопленок. Зеленым цветом отмечены биопленки, обработанные бактериофагом vB_SauM-515A1; синим — обработанные бактериофагом vB_Saup-436A; оранжевым — необработанный контроль. Отсутствие данных в столбце говорит об устойчивости штамма к действию соответствующего бактериофага. Разбросы показывают среднее квадратичное отклонение. * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$; *** — $p \leq 0,001$

полученным результатам, vB_SauM-515A1 (род *Kayvirus*, семейство *Herelleviridae*) показал большую эффективность против планктонных клеток, в сравнении с vB_Saup-436A (род *Rosenblumvirus*, семейство *Rountreeviridae*), что согласуется с ранее опубликованной информацией по этим бактериофагам [11]. Для других литических бактериофагов семейства *Herelleviridae* (ранее *Myoviridae*) также показано, что спектр их литической активности в зависимости от коллекции варьируется от 85,3 до 99,2%, в то время как для представителей семейства *Rountreeviridae* (ранее *Podoviridae*) этот показатель составляет 64–68% [11, 25, 26].

В случае биопленок было показано, что бактериофаг vB_SauM-515A1 стимулировал увеличение биомассы биопленки, тогда как фаг vB_Saup-436A способствовал снижению ее количества (рис. 1). Ранее сообщалось о способности миовируса phiPLA-RODI, относящегося к тому же роду, что и vB_SauM-515A1, стимулировать образование биопленок у *S. aureus* [9]. Авторы объясняют наблюдаемые результаты увеличением количества вДНК в матриксе, что, в свою очередь, связано с высокой литической активностью бактериофагов этого семейства. Увеличенное количество вДНК способствует структурной целостности и стабильности биопленки, а также модулирует образование амилоидных волокон, необходимых для поддержания архитектуры биопленки [27]. В другой работе исследователи показали, что использование фагов родов *Kayvirus* и *Rosenblumvirus* (отдельно и в комбинации) на начальных стадиях формирования или на зрелой биопленке не приводит к снижению ее количества [8]. Авторы наблюдали такой эффект при использовании фагов как при низких (0,1), так и при высоких (10) значениях MOI. При этом спустя 24 ч инкубации наблюдалось увеличение количества биопленки, за исключением случая обработки зрелой биопленки смесью фагов в MOI 10.

Стоит отметить, что в обсуждаемых работах авторы ограничились тестированием одного и двух бактериальных

изолятов, что накладывает ограничение на полноценное сравнение результатов. Тем не менее имеющиеся данные указывают на тенденцию фагов рода *Kayvirus* к стимуляции биопленкообразования у штаммов *S. aureus*. В случае обработки биопленок бактериофагом рода *Rosenblumvirus*, согласно нашим данным, наблюдалось либо снижение количества биомассы, либо отсутствие значимого воздействия. Возможно, vB_Saup-436A вызывает менее активный лизис клеток и меньшее высвобождение вДНК, что препятствует стимуляции образования биопленок. В связи с этим перспективным подходом в борьбе с биопленками представляется комбинированное применение бактериофагов, как в виде коктейля из нескольких фагов, так и в сочетании с агентами, разрушающими матрикс, такими как деполимеразы [28].

Необходимо также отметить, что в настоящей работе оценку эффективности фагов проводили методом окраски кристаллическим фиолетовым биомассы биопленок, включающей матрикс и клетки (как живые, так и мертвые). Такой метод не позволяет оценить долю жизнеспособных клеток после обработки антибактериальными агентами, поэтому для более полного представления о влиянии фагов на биопленки необходимо проводить дополнительные исследования.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование подчеркивает сложность и неоднозначность влияния бактериофагов на биопленку *S. aureus*, особенно в случае клинических изолятов с высокой антибиотикорезистентностью. Несмотря на способность фагов vB_SauM-515A1 и vB_Saup-436A подавлять рост планктонных клеток, их эффективность против биопленок штаммов *S. aureus* оказалась низкой. Полученные результаты подчеркивают важность подбора фагов с учетом их специфических характеристик и показателей эффективности против биопленок, а также

возможную необходимость комбинированных подходов, включающих бактериофаги и агенты, разрушающие матрикс биопленки. Вместе с тем, следует учитывать, что результаты данной работы получены в эксперименте *in vitro* с использованием ограниченного набора методов.

Для трансляции полученных результатов в клиническую практику необходимы дальнейшие исследования, включая эксперименты на моделях *in vivo*, которые позволят более точно оценить эффективность и безопасность предложенных подходов в условиях, приближенных к реальным.

Литература

- Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2022; 400: 2221–48.
- Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Staphylococcus Aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18: 7602.
- Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial Treatment of Staphylococcus Aureus Biofilms. *Antibiotics*. 2023; 12: 87.
- Liu K, Wang C, Zhou X, Guo X, Yang Y, Liu W, et al. Bacteriophage Therapy for Drug-Resistant Staphylococcus Aureus Infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2024; 14.
- Plumet L, Ahmad-Mansour N, Dunyach-Remy C, Kissa K, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Bacteriophage Therapy for Staphylococcus Aureus Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 907314.
- Gordina E, Bozhkova S, Smirnova LN. Effects of Bacteriophages on Biofilms Formed by Staphylococcus Aureus Isolated from Patients with Orthopedic Infection. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2022; 24: 283–8.
- Totten KMC, Patel R. Phage Activity against Planktonic and Biofilm Staphylococcus Aureus Periprosthetic Joint Infection Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2022; 66: e01879.
- Hosseini Doust Z, Tufenkji N, van de Ven TGM. Formation of Biofilms under Phage Predation: Considerations Concerning a Biofilm Increase. *Biofouling*. 2013; 29: 457–68.
- Fernández L, González S, Campelo AB, Martínez B, Rodríguez A, García P. Low-Level Predation by Lytic Phage phiPLA-RODI Promotes Biofilm Formation and Triggers the Stringent Response in Staphylococcus Aureus. *Scientific Reports*. 2017; 7: 40965.
- Eucast: EUCAST Available from: <https://www.eucast.org/> (accessed on 13 November 2024).
- Komienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae Bacteriophages to the Effectiveness of Anti-Staphylococcal Therapeutic Cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10: 18612.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 2000; 38 (3): 1008–15.
- Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. High Prevalence of Icaadbc Genes Responsible for Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus From Hospitalized Children. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*. 2015; 3.
- Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus. *Methods Mol Biol*. 2007; 391: 127–44.
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS*. 2007; 115: 891–9.
- Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. *Methods Mol Biol*. 2009; 501: 81–85.
- Gostev V, Kruglov A, Kalinogorskaya O, Dmitrenko O, Khokhlova O, Yamamoto T, et al. Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Circulating in the Russian Federation. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017; 53: 189–94.
- Wang X, Zhao H, Wang B, Zhou Y, Xu Y, Rao L, et al. Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus ST8 Isolates in China with Potential High Virulence. *Emerg Microbes Infect*. 2022; 11: 507–18.
- Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, Alabi A, Breurec S, Coombs G, et al. Origin, Evolution, and Global Transmission of Community-Acquired Staphylococcus Aureus ST8. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; 114: E10596–E10604.
- Xu K, Wang Y, Jian Y, Chen T, Liu Q, Wang H, et al. Staphylococcus Aureus ST1 Promotes Persistent Urinary Tract Infection by Highly Expressing the Urease. *Front Microbiol*. 2023; 14: 1101754.
- Smith JT, Eckhardt EM, Hansel NB, Rahmani Eliato T, Martin IW, Andam CP. Genome Evolution of Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in the Americas. *Microbiol Spectr*. 2022; 10: e0020122.
- Kurt K, Rasigade J-P, Laurent F, Goering RV, Žemličková H, Machova I, et al. Subpopulations of Staphylococcus Aureus Clonal Complex 121 Are Associated with Distinct Clinical Entities. *PLoS One*. 2013; 8: e58155.
- Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The Intercellular Adhesion (Ica) Locus Is Present in Staphylococcus Aureus and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun*. 1999; 67: 5427–33.
- Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel)*. 2022; 12 (1): 12.
- Moller AG, Winston K, Ji S, Wang J, Davis MNH, Solís-Lemus CR, et al. Genes Influencing Phage Host Range in Staphylococcus Aureus on a Species-Wide Scale. *mSphere*. 2021; (6): e01263.
- Göller PC, Elsener T, Lorgé D, Radulovic N, Bernardi V, Naumann A, et al. Multi-Species Host Range of Staphylococcal Phages Isolated from Wastewater. *Nat Commun*. 2021; 12: 6965.
- Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. *Molecular microbiology*. 2016; 99 (1): 123–34.
- Duarte AC, Fernández L, Jurado A, Campelo AB, Shen Y, Rodríguez A, et al. Synergistic Removal of Staphylococcus Aureus Biofilms by Using a Combination of Phage Kayvirus Rodi with the Exopolysaccharide Depolymerase Dpo7. *Front Microbiol*. 2024; 15: 1438022.

References

- Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2022; 400: 2221–48.
- Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Staphylococcus Aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18: 7602.
- Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial Treatment of Staphylococcus Aureus Biofilms. *Antibiotics*. 2023; 12: 87.
- Liu K, Wang C, Zhou X, Guo X, Yang Y, Liu W, et al. Bacteriophage Therapy for Drug-Resistant Staphylococcus Aureus Infections.

- Front. Cell. Infect. Microbiol. 2024; 14.
5. Plumet L, Ahmad-Mansour N, Dunyach-Remy C, Kissa K, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Bacteriophage Therapy for Staphylococcus Aureus Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022; 12: 907314.
 6. Gordina E, Bozhkova S, Smirnova LN. Effects of Bacteriophages on Biofilms Formed by Staphylococcus Aureus Isolated from Patients with Orthopedic Infection. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2022; 24: 283–8.
 7. Totten KMC, Patel R. Phage Activity against Planktonic and Biofilm Staphylococcus Aureus Periprosthetic Joint Infection Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2022; 66: e01879.
 8. Hosseini Doust Z, Tufenkji N, van de Ven TGM. Formation of Biofilms under Phage Predation: Considerations Concerning a Biofilm Increase. *Biofouling.* 2013; 29: 457–68.
 9. Fernández L, González S, Campelo AB, Martínez B, Rodríguez A, García P. Low-Level Predation by Lytic Phage phiPLA-RODI Promotes Biofilm Formation and Triggers the Stringent Response in Staphylococcus Aureus. *Scientific Reports.* 2017; 7: 40965.
 10. Eucast: EUCAST Available from: <https://www.eucast.org/> (accessed on 13 November 2024).
 11. Komiienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaeva A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae Bacteriophages to the Effectiveness of Anti-Staphylococcal Therapeutic Cocktails. *Sci Rep.* 2020; 10: 18612.
 12. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (3): 1008–15.
 13. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. High Prevalence of Icaadbc Genes Responsible for Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus From Hospitalized Children. *Archives of Pediatric Infectious Diseases.* 2015; 3.
 14. Cassat JE, Lee CY, Smeltzer MS. Investigation of Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus. *Methods Mol Biol.* 2007; 391: 127–44.
 15. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS.* 2007; 115: 891–9.
 16. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 81–85.
 17. Gostev V, Kruglov A, Kalinogorskaya O, Dmitrenko O, Khokhlova O, Yamamoto T, et al. Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Circulating in the Russian Federation. *Infection, Genetics and Evolution.* 2017; 53: 189–94.
 18. Wang X, Zhao H, Wang B, Zhou Y, Xu Y, Rao L, et al. Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus ST8 Isolates in China with Potential High Virulence. *Emerg Microbes Infect.* 2022; 11: 507–18.
 19. Strauß L, Stegger M, Akpaka PE, Alabi A, Breurec S, Coombs G, et al. Origin, Evolution, and Global Transmission of Community-Acquired Staphylococcus Aureus ST8. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2017; 114: E10596–E10604.
 20. Xu K, Wang Y, Jian Y, Chen T, Liu Q, Wang H, et al. Staphylococcus Aureus ST1 Promotes Persistent Urinary Tract Infection by Highly Expressing the Urease. *Front Microbiol.* 2023; 14: 1101754.
 21. Smith JT, Eckhardt EM, Hansel NB, Rahmani Eliato T, Martin IW, Andam CP. Genome Evolution of Invasive Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in the Americas. *Microbiol Spectr.* 2022; 10: e0020122.
 22. Kurt K, Rasigade J-P, Laurent F, Goering RV, Žemličková H, Machova I, et al. Subpopulations of Staphylococcus Aureus Clonal Complex 121 Are Associated with Distinct Clinical Entities. *PLoS One.* 2013; 8: e58155.
 23. Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, Götz F. The Intercellular Adhesion (Ica) Locus Is Present in Staphylococcus Aureus and Is Required for Biofilm Formation. *Infect Immun.* 1999; 67: 5427–33.
 24. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel).* 2022; 12 (1): 12.
 25. Moller AG, Winston K, Ji S, Wang J, Davis MNH, Solís-Lemus CR, et al. Genes Influencing Phage Host Range in Staphylococcus Aureus on a Species-Wide Scale. *mSphere.* 2021; (6): e01263.
 26. Göller PC, Elsener T, Lorgé D, Radulovic N, Bernardi V, Naumann A, et al. Multi-Species Host Range of Staphylococcal Phages Isolated from Wastewater. *Nat Commun.* 2021; 12: 6965.
 27. Schwartz K, Ganesan M, Payne DE, Solomon MJ, Boles BR. Extracellular DNA facilitates the formation of functional amyloids in Staphylococcus aureus biofilms. *Molecular microbiology.* 2016; 99 (1): 123–34.
 28. Duarte AC, Fernández L, Jurado A, Campelo AB, Shen Y, Rodríguez A, et al. Synergistic Removal of Staphylococcus Aureus Biofilms by Using a Combination of Phage Kayvirus Rodi with the Exopolysaccharide Depolymerase Dpo7. *Front Microbiol.* 2024; 15: 1438022.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ ЛИНЕЗОЛИДОМ И БАКТЕРИОФАГОМ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

М. А. Корниенко¹ ✉, В. В. Кузин², К. Н. Абдраймова¹, Р. Б. Городничев¹, Е. А. Шитиков¹¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия² Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболensk, Россия

Staphylococcus aureus — возбудитель широкого спектра инфекций, включая тяжелые системные заболевания, и часто характеризуется множественной лекарственной устойчивостью. В условиях растущей антибиотикорезистентности перспективным методом лечения стафилококковых инфекций является применение бактериофагов, особенно в сочетании с антибиотиками. Целью работы было оценить синергетический эффект линезолида и бактериофага vB_SauM-515A1 при лечении системной инфекции у мышей BALB/c. С использованием 36 животных были подобраны оптимальный способ введения и инфицирующая доза микроорганизма (внутривенно 5×10^8 КОЕ/мышь), а также установлены пороговые концентрации antimicrobных агентов при монотерапии. Оценку проводили по результатам исследования обсемененности внутренних органов (почки, селезенка) и крови. Для оценки комбинированного эффекта этиотропного действия линезолида (10 мг/кг массы животного) и фага (2×10^7 БОЕ/мышь) эксперимент проводили на контрольной и экспериментальных группах (по 12 особей в группе), получавших внутрибрюшинно монотерапию и комбинированное лечение через 2, 8, 18, 24 ч после заражения. Комбинированная терапия продемонстрировала более выраженный эффект: снижение бактериальной нагрузки в почках на два-три порядка по сравнению с монотерапией в первые сутки терапии. Таким образом, совместное использование линезолида и бактериофагов перспективно для лечения инфекций, вызванных *S. aureus*, и может повысить эффективность лечения и снизить риск побочных эффектов применения высоких доз антибиотиков.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, бактериофаги, фаговая терапия, комбинированная терапия, линезолид, синергизм, синергизм антибиотиков и бактериофагов, мышьиные модели, множественная лекарственная устойчивость

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>

Вклад авторов: М. А. Корниенко, В. В. Кузин — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; К. Н. Абдраймова — набор и обработка данных, Р. Б. Городничев — план исследований, набор и обработка данных; Е. А. Шитиков — план исследований, обработка данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФБУН ГНЦ ПМБ (ветеринарный протокол № 3-2024 от 10 июня 2024 г.), выполнено в соответствии с требованиями Федерального закона от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»; Приказа Минздрава России от 23.08.2010 № 708Н «Об утверждении правил лабораторной практики»; СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

✉ **Для корреспонденции:** Мария Андреевна Корниенко
ул. Малая Пироговская, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; kornienkomariya@gmail.com

Статья получена: 06.11.2022 **Статья принята к печати:** 09.12.2024 **Опубликована онлайн:** 25.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.062

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ETIOTROPIC THERAPY WITH LINEZOLID AND BACTERIOPHAGE IN A MOUSE MODEL FOR STAPHYLOCOCCAL INFECTION

Kornienko MA¹ ✉, Kuzin VV², Abdraimova NK¹, Gorodnichev RB¹, Shitikov EA¹¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia² State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, u.d. Serpukhov, Moscow region, Russia

Staphylococcus aureus is the causative agent of a wide range of infections, including severe systemic diseases, which is often multidrug resistant. Given the growing overall antibiotic resistance, a promising approach to treating staphylococcal infections is administration of bacteriophages, especially in combination with antibiotics. This study aimed to evaluate the synergistic effect of linezolid and bacteriophage vB_SauM-515A1 in combating a systemic infection in BALB/c mice. Using 36 animals, we established the optimal way of administration and the infecting dose of the microorganism (5×10^8 CFU/mouse intravenously), and identified the threshold concentrations of antimicrobial agents for monotherapy. The evaluation was based on the revealed contamination of internal organs (kidneys, spleen) and blood. To learn the etiotropic effect of linezolid (10 mg/kg animal weight) combined with the phage (2×10^7 PFU/mouse), we worked with a control group and a test group, 12 mice in each; 2, 8, 18, and 24 hours after infection, the former received the drug only, the latter — the investigated combination. Combined therapy had a more pronounced effect, decreasing the bacterial load in the kidneys by two to three orders of magnitude compared with monotherapy on the first day of treatment. Thus, the combined use of linezolid and bacteriophages is promising for the treatment of infections caused by *S. aureus*, and may increase the effectiveness of treatment and reduce the risk of side effects of high-dose antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, bacteriophages, phage therapy, combination therapy, linezolid, synergism, synergy between antibiotics and bacteriophages, mouse model, multidrug resistance

Funding: the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00443, <https://rscf.ru/project/22-15-00443/>

Author contribution: Kornienko MA, Kuzin VV — study planning, data collection and processing, article authoring; Abdraimova NK — data collection and processing, Gorodnichev RB — study planning, data collection and processing; Shitikov EA — study planning, data processing, article authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (Veterinary Minutes #3-2024 of June 10, 2024), performed in accordance with the requirements of Federal Law #61-FZ of 12.04.2010 "On the Circulation of Medicines"; Order #708N of the Ministry of Health of the Russian Federation of 23.08.2010 "On Approval of the Rules of Laboratory Practice"; SanPIN 3.3686-21 "Sanitary and epidemiological requirements for prevention of infectious diseases."

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria A. Kornienko
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435; kornienkomariya@gmail.com

Received: 06.11.2024 **Accepted:** 09.12.2024 **Published online:** 25.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.062

Staphylococcus aureus является ведущим возбудителем как госпитальных, так и внебольничных инфекций, вызывая широкий спектр заболеваний [1, 2]. По данным за 2019 г., *S. aureus* стал причиной более 1 млн смертей во всем мире, что в значительной мере связано с антибиотикорезистентностью штаммов этого вида [3]. Наибольшее клиническое значение имеют метициллин-устойчивые штаммы *S. aureus* (MRSA), которые не восприимчивы к бета-лактамам антибиотикам и часто обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [2].

В последнее время вирулентные бактериофаги, или фаги, привлекают интерес как средство лечения инфекций, вызванных устойчивыми бактериями [4]. Одним из наиболее перспективных направлений использования фагов является их комбинированное применение с антибиотиками. Такой подход позволяет повысить эффективность этиотропного лечения, снизить дозу антибиотиков, минимизировать их побочные эффекты и уменьшить вероятность развития устойчивости у патогенов за счет взаимодополняющих эффектов антимикробных агентов [4]. Выделяют два типа таких эффектов: аддитивный эффект и синергизм. Аддитивный эффект определяется как совокупное действие препаратов, равное сумме их отдельных эффектов. Синергизм — это усиление антимикробного эффекта, которое превышает аддитивное действие. Однако возможен и антагонизм, при котором активность препаратов в сочетании ниже, чем при раздельном использовании [5, 6].

Исследования *in vitro* показали, что комбинированное использование стафилофагов с большинством антибиотиков приводит преимущественно к синергизму [4]. Особую актуальность представляют исследования комбинированного использования линезолида и стафилофагов семейства *Herelleviridae*. Фаги этого семейства отличаются широким литическим спектром, что делает их перспективными для терапевтических целей [7–9]. Линезолид относится к препаратам для терапии стафилококковых инфекций, в частности характеризующимся устойчивостью к ванкомицину [10].

Механизм действия линезолида основан на ингибировании синтеза белка за счет нарушения формирования функционально активного комплекса для инициации трансляции [10]. Однако его применение связано с рядом ограничений. Так, при длительной терапии антибиотик может вызывать серьезные побочные эффекты [11]. Кроме того, использование линезолида против микроорганизмов, для подавления роста которых требуется концентрация препарата 4 мкг/мл и выше, может приводить к снижению клинической эффективности [10], что связано с особенностями его введения и возможными колебаниями концентрации в плазме крови [12]. Таким образом, комбинированная терапия линезолидом и стафилофагами способна повысить эффективность лечения и снизить риск побочных эффектов благодаря уменьшению дозы антибиотика, что делает этот подход перспективным для клинической практики.

Синергетический эффект комбинации линезолида и бактериофагов семейства *Herelleviridae* был ранее продемонстрирован *in vitro* в нашей [13] и других работах [14, 15]. Взаимодополняющее действие также было подтверждено на моделях стафилококковой инфекции у мышей [16–18]. Тем не менее наличие антагонистического эффекта описано для фагов и линезолида в нескольких исследованиях [19, 20] и, вероятно, связано с концентрацией антибиотика, а также в случае биопленок с последовательностью обработки агентами.

Целью настоящего исследования было расширение ранее полученных данных о синергизме линезолида и бактериофага vB_SauM-515A1 (семейство *Herelleviridae*) [13] за счет оценки раздельного и комбинированного действия линезолида и бактериофага при лечении системной стафилококковой инфекции у мышей линии BALB/c. Полученные данные могут стать ключевыми для оптимизации комбинированной терапии инфекций, вызванных MRSA, и способствовать повышению ее эффективности в клинической практике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы, фаги, условия хранения и культивирования

В исследовании использовали ранее описанный штамм *S. aureus* SA413 из коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства». Штамм был выделен из гнойного отделяемого мягких тканей и относился к метициллин-чувствительным *S. aureus* сиквенс-типа 8; минимальная подавляющая концентрация линезолида для него составляла 8 мкг/мл. Выбор штамма для исследования обусловлен ранее продемонстрированным *in vitro* синергетическим эффектом бактериофага и линезолида, наблюдаемым при воздействии на данную бактериальную культуру [13]. Культивирование штамма проводили на питательной среде «Мясо-пептонный агар» (МПА) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Бактериофаг vB_SauM-515A1 был ранее выделен из коммерческого фагового препарата «Бактериофаг стафилококковый» серии P332 («Микроген»; Россия). Детальная характеристика фага представлена ранее. Бактериофаг наращивали на штамме *S. aureus* SA413 в среде LB (от англ. lysogeny broth) в модификации Миллера (Oxoid; Великобритания) при температуре 37 °C. Затем фаговый лизат пропускали через шприцевой фильтр 0,22 мкм с гидрофильной полиэфирсульфоновой мембраной (Millipore; США) и очищали методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы, как описано ранее [7]. После очистки бактериофаг растворяли в физиологическом растворе. Титр бактериофага в препарате оценивали на основании стандартной методики титрования по Грациа [22]. Препарат бактериофага хранился при температуре 4 °C.

Животные

В качестве модельных животных использовали самок мышей линии BALB/c массой 18–22 г, возрастом 6–8 недель, полученных из питомника лабораторных животных ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий федерального медико-биологического агентства» филиал «Столбовая» (Сертификат серии № 20353 от 30.05.2024). Мышей содержали группами в стандартных условиях в соответствии с международными нормами и требованиями, с обеспечением свободного доступа к воде и корму («Лабораторкорм»; Россия). Эвтаназию проводили методом CO₂-ингаляции.

У павших мышей исследовали паренхиматозные органы (селезенку, печень) на наличие стафилококковой инфекции способом отпечатков на поверхность плотной

питательной среды «Стафилококкагар» (ФБУН ГНЦ ПМБ; Россия).

Моделирование стафилококковой инфекции у мышей

Для моделирования стафилококковой инфекции тестировали различные инфицирующие дозы штамма *S. aureus* SA413 и два типа введения: внутривенный и внутрибрюшинный. Бактериальный инокулят выращивали в жидкой питательной среде до оптической плотности $OD_{620} = 0,75$ (5×10^9 КОЕ/мл) и разводили физиологическим раствором до нужной концентрации. Животные были разделены на шесть групп (по три мыши): группа 1 — внутривенное введение 5×10^6 КОЕ/мышь; группа 2 — внутривенное введение 5×10^7 КОЕ/мышь; группа 3 — внутривенное введение 5×10^8 КОЕ/мышь; группа 4 — внутрибрюшинное введение 5×10^6 КОЕ/мышь; группа 5 — внутрибрюшинное введение 5×10^7 КОЕ/мышь; группа 6 — внутрибрюшинное введение 5×10^8 КОЕ/мышь. Инокулят вводили в объеме 200 мкл (внутрибрюшинно) и 100 мкл (внутривенно). Животных наблюдали в течение трех суток для учета летальных случаев. На третий день у выживших животных оценивали бактериальную обсемененность паренхиматозных органов и крови.

Подбор доз антимикробных агентов

Для оценки терапевтических и минимальных пороговых доз линезолида и бактериофага vB_SauM-515A1 мышей разделили на 6 групп (по три мыши). Через 2, 8, 18 и 24 ч после инфицирования мышам вводили либо линезолид (Sigma-Aldrich; США) в концентрациях 10 мг/кг массы животного или 40 мг/кг массы животного, либо бактериофаг vB_SauM-515A1 в дозах 2×10^5 , 2×10^6 и 2×10^7 БОЕ/мышь. Для получения препаратов необходимых концентраций использовали физиологический раствор. Контрольным животным без лечения вводили физиологический раствор по вышеуказанной схеме. Препараты вводили внутрибрюшинно в объеме 200 мкл. Животных наблюдали в течение трех суток, после чего проводили эвтаназию и забор паренхиматозных органов (селезенка, почки) и крови для оценки бактериальной обсемененности и содержания фага. Кровь (1 мл) извлекали методом пункции из сердца. Отобранную кровь перемещали в стерильные вакуумные пробирки с натрия гепарином (без геля) (Improvacuter; Китай), предназначенные для исследования плазмы крови.

Оценка эффективности комбинированного воздействия линезолида и бактериофага

Для оценки эффективности комбинированного воздействия антибактериальные агенты использовали в минимальных пороговых дозах. Исследование проводили на четырех экспериментальных группах животных (по 12 мышей), инфицированных штаммом *S. aureus* SA413 в дозе и способом, выбранным по результатам предварительных экспериментов. Животные получали препараты через 2, 8, 18 и 24 ч после заражения внутрибрюшинно в объеме 200 мкл в случае монотерапии; при комбинированной терапии — сначала антибиотик в объеме 200 мкл в одну сторону брюшины, затем сразу фаг в объеме 200 мкл в другую сторону брюшины. Первой группе мышей проводили терапию линезолидом; второй группе — терапию бактериофагом; третьей группе — комбинированную терапию бактериофагом и линезолидом; четвертой группе,

контрольной, проводили инъекции физиологического раствора. В дальнейшем осуществляли эвтаназию трем мышам из каждой группы на первые и вторые сутки и шести мышам — на третьи сутки для анализа бактериальной обсемененности и содержания фага в органах и крови.

Оценка бактериальной обсемененности и наличия бактериофагов в паренхиматозных органах и крови

Органы гомогенизировали в стерильных ступках, добавляя 1 мл физиологического раствора на орган. Далее кровь и образцы суспензий десятикратно разводили в физиологическом растворе и высевали на плотную питательную среду «Стафилококкагар» (ФБУН ГНЦ ПМБ; Россия). Параллельно в суспензиях оценивали содержание бактериофага методом титрования по Грациа на среде «Стафилококкагар» (ФБУН ГНЦ ПМБ) с использованием 100 мкл серийных разведений образца. Исследование проводили в пяти технических повторах.

Представление данных и статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad Software 8; США): нормальность распределения данных подтверждали на основании критерия Шапиро–Уилка, для сравнения средних значений между группами использовали *t*-тест Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Заявление о соблюдении этических стандартов

Все эксперименты с лабораторными животными были одобрены комиссией по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ и проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» («Guide for the Care and Use of Laboratory Animals») [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отработка модели стафилококковой инфекции

Для построения адекватной модели стафилококковой инфекции на лабораторных животных были проведены предварительные исследования по подбору заражающей дозы, обеспечивающей обсемененность паренхиматозных органов (селезенки, почек) и крови штаммом *S. aureus* SA413 на третьи сутки после заражения без гибели животных от бактериальной инфекции.

Согласно результатам, при внутрибрюшинном введении бактерий в дозе 5×10^8 КОЕ/мышь происходила гибель всех животных уже на первые сутки после заражения, что, предположительно, связано с высокой концентрацией исследуемого штамма в области введения и последующим токсическим шоком. При внутрибрюшинном введении бактериальной культуры в концентрациях 5×10^6 и 5×10^7 КОЕ/мышь, а также при внутривенном введении в любых исследуемых концентрациях гибели мышей не наблюдалось в течение трех суток после инфицирования. При этом только мыши, получившие дозу 5×10^8 КОЕ/мышь внутривенно, демонстрировали угнетенное состояние (снижение двигательной активности и сонливость), взъерошенную шерсть и гиперемию век, что указывает на развитие инфекционного процесса.

Патологоанатомическое вскрытие мышей на третьи сутки показало наличие стафилококков в почках

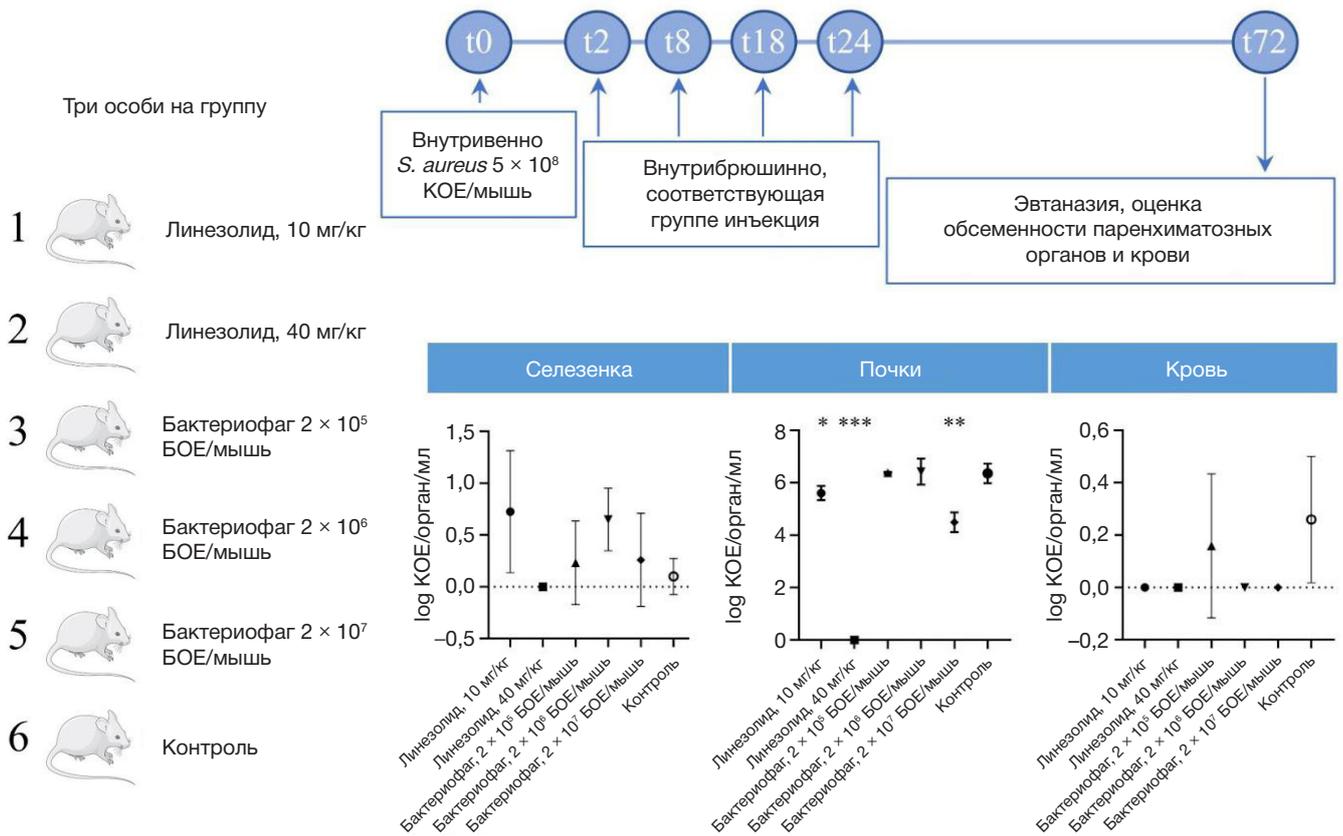


Рис. 1. Схема подбора минимальных пороговых и терапевтических доз линезолида и бактериофага для лечения стафилококковой инфекции. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$; *** — $p < 0,0001$

($8,9 \times 10^5 - 3,6 \times 10^6$ КОЕ/орган/мл) и небольшое количество возбудителя в селезенках ($37 - 52$ КОЕ/орган/мл) и крови ($3,4 \times 10^2 - 1,3 \times 10^3$ КОЕ/мл) при внутривенном заражении в дозе 5×10^8 КОЕ/мышь. При более низких дозах в обоих способах заражения наблюдали отсутствие или единичные бактериальные колонии.

Определение минимальных пороговых и терапевтических доз линезолида и бактериофага для лечения стафилококковой инфекции

Оценка минимальных пороговых и терапевтических доз антимикробных агентов проведена для двух концентраций линезолида и трех вариантов доз бактериофага с использованием 18 мышей (рис. 1).

Визуальный осмотр показал угнетенное состояние, взъерошенную шерсть и гиперемию век у мышей в контрольной и четырех из пяти опытных групп (линезолид 10 мг/кг массы животного и все дозы бактериофага). Гибели животных на протяжении всего времени эксперимента не происходило. Животные, получавшие лечение линезолидом в дозе 40 мг/кг массы животного, вышеуказанных признаков не имели.

Патологоанатомическое вскрытие на третьи сутки выявило низкую обсемененность селезенок (0–25 КОЕ/орган/мл) во всех группах и отсутствие бактерий в крови, за исключением контрольной группы (0–3 КОЕ/мл) и группы, получавшей бактериофаг 2×10^5 БОЕ/мышь. Наиболее показательными были данные по обсемененности почек. Доза линезолида 40 мг/кг массы животного обеспечивала элиминацию патогена из почек и являлась, по всей видимости, терапевтической. Доза 10 мг/кг массы животного приводила к снижению обсемененности

на один порядок, что определяло ее как пороговую. Дозы бактериофага 2×10^5 и 2×10^6 БОЕ/мышь не показали значимых различий по сравнению с контролем и были приняты за неэффективные. Бактериофаг в дозе 2×10^7 БОЕ/мышь снижал обсемененность почек на один порядок и был признан минимальной пороговой дозой; терапевтическая доза выявлена не была.

Фаговые частицы удалось обнаружить только в почках мышей, получавших дозу 2×10^7 БОЕ/мышь (30–70 БОЕ/орган). В крови и селезенках животных бактериофагов выявлено не было.

Оценка эффективности комбинированного воздействия линезолида и бактериофага

Оценка комбинированного воздействия антимикробных агентов в пороговых концентрациях (линезолид: 10 мг/кг массы животного; бактериофаг: 2×10^7 БОЕ/мышь) проведена с использованием 48 мышей (рис. 2).

По визуальным показателям состояние животных во всех группах свидетельствовало о наличии инфекционного процесса и характеризовалось описанным в предыдущем эксперименте угнетенным состоянием.

На первые сутки не было выявлено различий в обсемененности паренхиматозных органов между группами, получившими монотерапию, и контрольной группой (рис. 2Б). В группе с комбинированной терапией отмечено снижение обсемененности селезенок практически до нулевых значений ($p = 0,0014$) и снижение обсемененности почек на один-два порядка по сравнению с контролем ($p = 0,0318$), тогда как обсемененность крови сохранялась на уровне контрольной группы.

А 12 особей на группу

- 1  Линезолид
- 2  Бактериофаг
- 3  Комбинация
- 4  Контроль

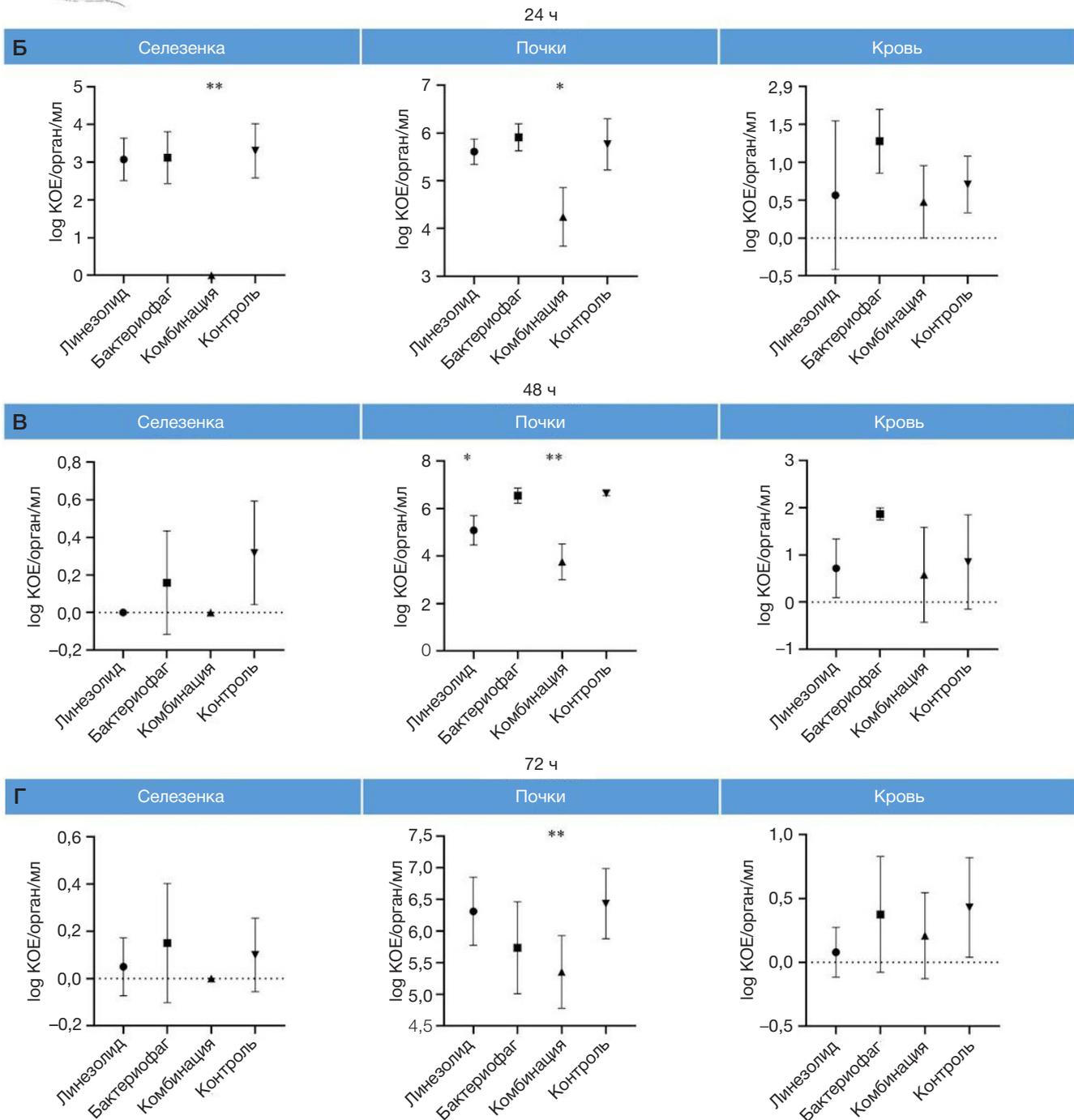
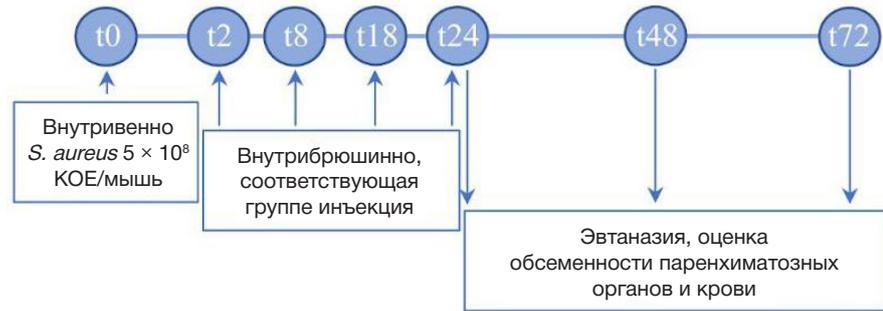


Рис. 2. Схема и основные результаты оценки эффективности комбинированного воздействия линезолида и бактериофага при стафилококковой бактериемии. А. Схема эксперимента. Б–Г. Результаты оценки обсемененности паренхиматозных органов и крови через 24, 48 и 72 ч после инфицирования соответственно. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$

Результаты, полученные на вторые сутки, представлены на рис. 2В. В селезенках животных всех групп, кроме получавших линезолид, наблюдалось незначительное присутствие стафилококков. В группе с линезолидом бактерии в селезенках отсутствовали. Обсемененность почек в группе лечения бактериофагом оставалась на уровне контрольной группы, в группе с антибиотиком достоверно снизилась менее чем на порядок ($p = 0,0127$), а при комбинированной терапии она снижалась на два-три порядка относительно контроля ($p = 0,0028$). Обсемененность крови во всех группах сохранялась на уровне до 10^2 КОЕ/мл.

На третьи сутки после заражения отмечалось лишь незначительное присутствие стафилококков в посевах из гомогенатов селезенки во всех исследуемых группах, что говорит о самостоятельной элиминации патогена из данного органа (рис. 2Г). Обсемененность почек мышей, получавших лечение линезолидом, вернулась к показателям контрольной группы, тогда как у мышей, пролеченных бактериофагом, оставалась на уровне контроля. В случае комплексного лечения линезолидом и бактериофагом обсемененность оказалась на порядок ниже контрольных значений ($p = 0,0079$). Обсемененность крови во всех группах сохранялась на уровне контрольной.

Определение содержания бактериофага показало его незначительное присутствие в ходе всего эксперимента ($20\text{--}250$ БОЕ/орган/мл) в почках животных, получавших дозу 2×10^7 БОЕ/мышь как в виде монотерапии, так и в случае комбинированного применения. Достоверных различий между группами выявлено не было. В селезенках и крови бактериофаг не обнаружен.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Комплексная терапия бактериофагами и антибиотиками представляется одним из наиболее перспективных решений для борьбы с патогенами с МЛУ. Многочисленные *in vitro* исследования показывают многообещающие результаты, демонстрируя синергетический эффект этих агентов. Однако для подтверждения их эффективности и практического потенциала важно проведение *in vivo* экспериментов. Исследования на животных моделях позволяют оценить возможности и ограничения такой терапии в условиях, приближенных к клинической практике, и дают возможность выявить аспекты, которые требуют дальнейшего изучения перед полноценным внедрением в медицину.

Для оценки эффективности совместного использования бактериофага vB_SauM-515A1 и линезолида была выбрана модель системной инфекции с использованием мышей BALB/c, что соответствует подходам, применяемым в аналогичных исследованиях [24, 25]. При этом основное внимание в предварительных экспериментах уделялось выбору метода введения, подбору инфицирующей дозы и установлению пороговых концентраций действующих агентов. В ранее опубликованных работах было показано, что инфицирующая доза *S. aureus* меняется в зависимости от штамма в пределах от 10^6 до 10^8 КОЕ/мышь [24, 26, 27]. Например, доза 10^6 КОЕ/мышь была выбрана для штамма USA300, известного своей высокой вирулентностью, наблюдение в данном случае ограничивалось периодом в 24 ч [28]. В то же время доза 10^8 КОЕ/мышь, применяемая в исследованиях на штаммах с МЛУ, приводила к частичной гибели мышей в течение 10–24 ч и, в отдельных случаях, к третьим суткам [24, 27].

В нашем исследовании для штамма SA413, относящегося к сиквенс-типу 8 — одному из наиболее распространенных и ассоциированных с госпитальными инфекциями по всему миру, — оптимальной была выбрана доза 5×10^8 КОЕ/мышь при внутривенном введении. Соответствующая доза позволяла достичь стабильной обсемененности органов по истечении трех суток, что обеспечивало адекватные условия для наблюдения за эффектами от терапии. При этом именно внутривенное введение показало наиболее воспроизводимые результаты, что также согласуется с данными других авторов [27, 29].

Выбор пороговых концентраций антимикробных агентов, не вызывающих при монотерапии элиминации патогена, продемонстрировал, что линезолид в концентрации 10 мг/кг массы животного является наиболее подходящим для дальнейших исследований. Соответствующая концентрация антибиотика обеспечивала минимальное снижение бактериальной обсемененности, что также согласуется с результатами, полученными другими исследователями [10]. В то же время концентрация 40 мг/кг массы животного полностью устраняла бактерии из почек к третьему дню эксперимента, что также подтверждается данными других авторов [29]. Следует отметить, что линезолид и бактериофаг вводили внутривенно, чтобы избежать повреждения сосудов и риска кровоизлияний, связанных с повторными инъекциями. В частности, эффективность внутривенного введения бактериофагов ранее была продемонстрирована при стафилококковой инфекции у мышей К-подобным фагом фSA039 [30].

Согласно опубликованным данным по терапевтическому использованию бактериофагов на мышинных моделях, количество антимикробного агента меняется от 10^6 до 10^{10} БОЕ/мышь [27, 31]. В рамках нашего исследования минимальная пороговая доза бактериофага составила 2×10^7 БОЕ/мышь. При терапии инфицированных мышей этой дозой наблюдалось лишь частичное снижение обсемененности почек, что подчеркивает необходимость использования высоких концентраций бактериофагов при монотерапии. Более того, отсутствие фагов в крови и селезенке указывает на возможные ограничения системного распространения фагов, что еще раз подчеркивает необходимость применения комплексного подхода в терапии.

Комбинированное применение линезолида и бактериофага в пороговых дозах продемонстрировало более выраженный эффект по сравнению с монотерапией: уменьшение обсемененности почек на два-три порядка по сравнению с контролем в первые сутки подтверждает потенциальную синергию антимикробных агентов. В то же время к третьим суткам снижение бактериальной обсемененности в группе комбинированного лечения было менее выраженным, чем на первых стадиях, что может свидетельствовать о необходимости более длительного курса лечения для достижения полного терапевтического эффекта.

Полученные данные о большей эффективности комбинированной терапии по сравнению с монотерапией согласуются с рядом исследований эффективности совместного применения линезолида и бактериофагов семейства *Herelleviridae* на моделях других типов инфекций, вызванных *S. aureus*. Ранее на мышинной модели стафилококковой инфекции диабетической стопы было продемонстрировано, что однократное введение фага семейства *Herelleviridae* приводит к сопоставимой эффективности терапии линезолидом, при этом

комбинированная терапия была гораздо эффективнее в купировании всего инфекционного процесса (бактериальная нагрузка, количество поражений, активность миелопероксидазы стопы и гистопатологический анализ), а также ускорении всего процесса заживления тканей [16]. В исследовании эффективности комплексной терапии линезолида и бактериофага MR-5 (семейство *Herelleviridae*) на мышинной модели кожной инфекции также было показано значительное снижение бактериальной нагрузки при их совместном применении, что привело к более быстрому разрешению инфекции [17]. Кроме того, описано успешное применение комбинированного подхода в модели инфекции, вызванной *S. aureus*, после артропластики. Мышам имплантировали проволоку, покрытую фагом (10^9 БОЕ/мл) и/или линезолидом в интрамедуллярный канал бедренной кости с последующей инокуляцией MRSA. Применение комплексного покрытия при имплантации привело к снижению бактериальной

адгезии и более быстрому восстановлению двигательной функции конечности [18].

Выводы

Проведенное исследование подтвердило перспективность комбинированной терапии линезолидом и бактериофагом vB_SauM-515A1 для лечения системных инфекций, вызванных *S. aureus*. Установлено, что использование пороговых доз антибиотика и бактериофага позволяет добиться значительного снижения бактериальной обсемененности паренхиматозных органов, что свидетельствует о синергетическом эффекте. Результаты демонстрируют, что комбинированная терапия более эффективна по сравнению с монотерапией, особенно на ранних стадиях эксперимента, и может способствовать снижению дозировки антибиотика, что минимизирует возможные побочные эффекты.

Литература

- Cheung GYC, Bae JS; Otto M. Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Virulence* 2021; 12: 547–69, DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.
- Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 107, DOI: 10.3389/fcimb.2020.00107.
- Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2022; 400: 2221–48, DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- Łusiak-Szelachowska M, Międzybrodzki R, Drulis-Kawa Z, Cater K Knežević P, Winogradow C, Amaro K, et al. Bacteriophages and Antibiotic Interactions in Clinical Practice: What We Have Learned so Far. *J Biomed Sci*. 2022; 29: 23, DOI: 10.1186/s12929-022-00806-1.
- Dickey J, Perrot V. Adjunct Phage Treatment Enhances the Effectiveness of Low Antibiotic Concentration against *Staphylococcus Aureus* Biofilms in Vitro. *PLoS ONE*. 2019; 14: e0209390, DOI: 10.1371/journal.pone.0209390.
- Kumaran D, Taha M, Yi Q, Ramirez-Arcos S, Diallo J-S, Carli A, et al. Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *Front Microbiol*. 2018; 9: 127, DOI: 10.3389/fmicb.2018.00127.
- Kornienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae Bacteriophages to the Effectiveness of Anti-Staphylococcal Therapeutic Cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10: 18612, DOI: 10.1038/s41598-020-75637-x.
- Leskinen K, Tuomala H, Wicklund A, Horsma-Heikinen J, Kuusela P, Skurnik M, et al. Characterization of vB_SauM-fRuSau02, a T4-like Bacteriophage Isolated from a Therapeutic Phage Cocktail. *Viruses*. 2017; 9: 258, DOI: 10.3390/v9090258.
- Abatangelo V, Peressutti Bacci N, Boncompain CA, Amadio AF, Carrasco S, Suárez CA, et al. Correction: Broad-Range Lytic Bacteriophages That Kill *Staphylococcus Aureus* Local Field Strains. *PLoS ONE*. 2017; 12: e0187387, DOI: 10.1371/journal.pone.0187387.
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daurm RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011; 52 (3): 285–92. Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/cir034>.
- Bozdogan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: Activity, Mode of Action, and Mechanism of Resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004; 23: 113–9. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2003.11.003.
- Hui L-A, Bodolea C, Vlase L, Hiriscu EI, Popa A. Linezolid Administration to Critically Ill Patients: Intermittent or Continuous Infusion? A Systematic Literature Search and Review. *Antibiotics*. 2022; 11: 436. DOI: 10.3390/antibiotics11040436.
- Абдраймова Н. К., Корниенко М. А., Беспятых Д. А., Купцов Н. С., Городничев Р. Б., Шитиков Е. А. Комбинированное воздействие бактериофага VB_SAUM-515A1 и антибиотиков на клинические изоляты *Staphylococcus aureus*. *Вестник РГМУ*. 2022; DOI: 10.24075/vrgmu.2022.052.
- Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage Mediated Killing of *Staphylococcus Aureus* In Vitro on Orthopaedic K Wires in Presence of Linezolid Prevents Implant Colonization. *PLoS ONE*. 2014; 9: e90411. DOI:10.1371/journal.pone.0090411.
- Wang B, Xu Y, Zhao H, Wang X, Rao L, Guo Y, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in China: A Multicentre Longitudinal Study and Whole-Genome Sequencing. *Emerging Microbes & Infections*. 2022; 11: 532–42. DOI: 10.1080/22221751.2022.2032373.
- Chhibber S, Kaur T, Sandeep Kaur Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) from Diabetic Foot Infections. *PLoS ONE*. 2013; 8: e56022. DOI: 10.1371/journal.pone.0056022.
- Kaur S, Chhibber S. A Mouse Air Pouch Model for Evaluating the Anti-Bacterial Efficacy of Phage MR-5 in Resolving Skin and Soft Tissue Infection Induced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Folia Microbiol*. 2021; 66: 959–72, DOI: 10.1007/s12223-021-00895-9.
- Kaur S, Harjai K, Chhibber S. In Vivo Assessment of Phage and Linezolid Based Implant Coatings for Treatment of Methicillin Resistant *S. Aureus* (MRSA) Mediated Orthopaedic Device Related Infections. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0157626, DOI: 10.1371/journal.pone.0157626.
- Berryhill BA, Huseby DL, McCall IC, Hughes D, Levin BR. Evaluating the Potential Efficacy and Limitations of a Phage for Joint Antibiotic and Phage Therapy of *Staphylococcus Aureus* Infections. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021; 118, e2008007118. DOI: 10.1073/pnas.2008007118.
- Kumaran D, Taha M, Yi Q, Ramirez-Arcos S, Diallo J-S, Carli A, Abdelbary H. Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *Front Microbiol*. 2018; 9: 127. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00127.
- Kornienko M, Fisunov G, Bespiatykh D, Kuptsov N, Gorodnichev R, Klimina K, et al. Transcriptional Landscape of *Staphylococcus Aureus* Kayvirus Bacteriophage vB_SauM-515A1. *Viruses*. 2020;

- 12: 1320. DOI: 10.3390/v12111320.
22. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*. Humana Press: Totowa, NJ. 2009; p. 81–85.
 23. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press: Washington, D.C., 2011.
 24. García P, Moscoso M, Fernández MC, Fuentes-Valverde V, Pérez A, Bou G. Comparison of the in Vivo Efficacy of Ceftaroline Fosamil, Vancomycin and Daptomycin in a Murine Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2023; 62: 106836. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106836.
 25. Suligoy CM, Díaz RE, Gehrke A-K, Ring N, Yebra G, Alves J, et al. Acapsular *Staphylococcus Aureus* with a Non-Functional Agr Regains Capsule Expression after Passage through the Bloodstream in a Bacteremia Mouse Model. *Sci Rep*. 2020; 10: 14108 DOI: 10.1038/s41598-020-70671-1.
 26. Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Mouse Models for Infectious Diseases Caused by *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Immunological Methods*. 2014; 410: 88–99, DOI: 10.1016/j.jim.2014.04.007.
 27. Oduor JMO, Onkoba N, Maloba F, Arodi WO, Nyachio A. Efficacy of Lytic *Staphylococcus Aureus* Bacteriophage against Multidrug-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Mice. *J Infect Dev Ctries*. 2016; 10: 1208–13. DOI: 10.3855/jidc.7931.
 28. Sharma-Kuinkel BK, Zhang Y, Yan Q, Ahn SH, Fowler VG. Host Gene Expression Profiling and In Vivo Cytokine Studies to Characterize the Role of Linezolid and Vancomycin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Murine Sepsis Model. *PLoS ONE*. 2013; 8: e60463. DOI: 10.1371/journal.pone.0060463.
 29. Gordon O, Dikeman DA, Ortines RV, Wang Y, Youn C, Mumtaz M, et al. The Novel Oxazolidinone TBI-223 Is Effective in Three Preclinical Mouse Models of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infection. *Microbiol Spect*. 2022; 10: e02451-21, DOI: 10.1128/spectrum.02451-21.
 30. Fujiki J, Nakamura T, Nakamura K, Nishida K, Amano Y, Watanabe Y, et al. Biological properties of *Staphylococcus virus* –SA012 for phage therapy. *Scientific reports*. 2022; 12 (1): 21297. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25352-6>.
 31. Plumet L, Ahmad-Mansour N, Dunyach-Remy C, Kissa K, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Bacteriophage Therapy for *Staphylococcus Aureus* Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 907314. DOI: 10.3389/fcimb.2022.907314.

References

1. Cheung GYC, Bae JS; Otto M. Pathogenicity and Virulence of *Staphylococcus Aureus*. *Virulence* 2021; 12: 547–69, DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.
2. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10: 107, DOI: 10.3389/fcimb.2020.00107.
3. Ikuta KS, Swetschinski LR, Robles Aguilar G, Sharara F, Mestrovic T, et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*. 2022; 400: 2221–48, DOI: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
4. Łusiak-Szelachowska M, Międzybrodzki R, Drulis-Kawa Z, Cater K Knežević P, Winogradow C, Amaro K, et al. Bacteriophages and Antibiotic Interactions in Clinical Practice: What We Have Learned so Far. *J Biomed Sci*. 2022; 29: 23, DOI: 10.1186/s12929-022-00806-1.
5. Dickey J, Perrot V. Adjunct Phage Treatment Enhances the Effectiveness of Low Antibiotic Concentration against *Staphylococcus Aureus* Biofilms in Vitro. *PLoS ONE*. 2019; 14: e0209390, DOI: 10.1371/journal.pone.0209390.
6. Kumaran D, Taha M, Yi Q, Ramirez-Arcos S, Diallo J-S, Carli A, et al. Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *Front Microbiol*. 2018; 9: 127, DOI: 10.3389/fmicb.2018.00127.
7. Kornienko M, Kuptsov N, Gorodnichev R, Bespiatykh D, Guliaev A, Letarova M, et al. Contribution of Podoviridae and Myoviridae Bacteriophages to the Effectiveness of Anti-*Staphylococcal* Therapeutic Cocktails. *Sci Rep*. 2020; 10: 18612, DOI: 10.1038/s41598-020-75637-x.
8. Leskinen K, Tuomala H, Wicklund A, Horsma-Heikkinen J, Kuusela P, Skurnik M, et al. Characterization of vB_SauM-fRuSau02, a T4-like Bacteriophage Isolated from a Therapeutic Phage Cocktail. *Viruses*. 2017; 9: 258, DOI: 10.3390/v9090258.
9. Abatangelo V, Peressutti Bacci N, Boncompain CA, Amadio AF, Carrasco S, Suárez CA, et al. Correction: Broad-Range Lytic Bacteriophages That Kill *Staphylococcus Aureus* Local Field Strains. *PLoS ONE*. 2017; 12: e0187387, DOI: 10.1371/journal.pone.0187387.
10. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children: executive summary. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011; 52 (3): 285–92. Available from: <https://doi.org/10.1093/cid/cir034>.
11. Bozdogan B, Appelbaum PC. Oxazolidinones: Activity, Mode of Action, and Mechanism of Resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004; 23: 113–9. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2003.11.003.
12. Hui L-A, Bodolea C, Vlase L, Hiriscau EI, Popa A. Linezolid Administration to Critically Ill Patients: Intermittent or Continuous Infusion? A Systematic Literature Search and Review. *Antibiotics*. 2022; 11: 436. DOI: 10.3390/antibiotics11040436.
13. Abdraimova NK, Kornienko MA, Bespiatykh DA, Kuptsov NS, Gorodnichev RB, Shitikov EA. Combined effects of bacteriophage vB_SauM-515A1 and antibiotics on the *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Bulletin of RSMU*. 2022; DOI: 10.24075/brsmu.2022.052.
14. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage Mediated Killing of *Staphylococcus Aureus* In Vitro on Orthopaedic K Wires in Presence of Linezolid Prevents Implant Colonization. *PLoS ONE*. 2014; 9: e90411. DOI:10.1371/journal.pone.0090411.
15. Wang B, Xu Y, Zhao H, Wang X, Rao L, Guo Y, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in China: A Multicentre Longitudinal Study and Whole-Genome Sequencing. *Emerging Microbes & Infections*. 2022; 11: 532–42. DOI: 10.1080/22221751.2022.2032373.
16. Chhibber S, Kaur T, Sandeep Kaur Co-Therapy Using Lytic Bacteriophage and Linezolid: Effective Treatment in Eliminating Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) from Diabetic Foot Infections. *PLoS ONE*. 2013; 8: e56022. DOI: 10.1371/journal.pone.0056022.
17. Kaur S, Chhibber S. A Mouse Air Pouch Model for Evaluating the Anti-Bacterial Efficacy of Phage MR-5 in Resolving Skin and Soft Tissue Infection Induced by Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Folia Microbiol*. 2021; 66: 959–72, DOI: 10.1007/s12223-021-00895-9.
18. Kaur S, Harjai K, Chhibber S. In Vivo Assessment of Phage and Linezolid Based Implant Coatings for Treatment of Methicillin Resistant *S. Aureus* (MRSA) Mediated Orthopaedic Device Related Infections. *PLoS ONE*. 2016; 11: e0157626, DOI: 10.1371/journal.pone.0157626.
19. Berryhill BA, Huseby DL, McCall IC, Hughes D, Levin BR. Evaluating the Potential Efficacy and Limitations of a Phage for Joint Antibiotic and Phage Therapy of *Staphylococcus Aureus* Infections. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021; 118, e2008007118. DOI: 10.1073/pnas.2008007118.
20. Kumaran D, Taha M, Yi Q, Ramirez-Arcos S, Diallo J-S, Carli A, Abdelbary H. Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *Front Microbiol*. 2018; 9: 127. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00127.
21. Kornienko M, Fisunov G, Bespiatykh D, Kuptsov N, Gorodnichev R, Klimina K, et al. Transcriptional Landscape of *Staphylococcus Aureus* Kayvirus Bacteriophage vB_SauM-515A1. *Viruses*. 2020; 12: 1320. DOI: 10.3390/v12111320.
22. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of

- Bacteriophages Using the Small Drop Plaque Assay System. In: Clokie MRJ, Kropinski AM, editors. *Bacteriophages. Methods in Molecular Biology*. Humana Press: Totowa, NJ. 2009; p. 81–85.
23. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press: Washington, D.C., 2011.
24. García P, Moscoso M, Fernández MC, Fuentes-Valverde V, Pérez A, Bou G. Comparison of the in Vivo Efficacy of Ceftaroline Fosamil, Vancomycin and Daptomycin in a Murine Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2023; 62: 106836. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2023.106836.
25. Suligoy CM, Díaz RE, Gehrke A-K, Ring N, Yebra G, Alves J, et al. Acapsular *Staphylococcus Aureus* with a Non-Functional Agr Regains Capsule Expression after Passage through the Bloodstream in a Bacteremia Mouse Model. *Sci Rep*. 2020; 10: 14108 DOI: 10.1038/s41598-020-70671-1.
26. Kim HK, Missiakas D, Schneewind O. Mouse Models for Infectious Diseases Caused by *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Immunological Methods*. 2014; 410: 88–99, DOI: 10.1016/j.jim.2014.04.007.
27. Oduor JMO, Onkoba N, Maloba F, Arodi WO, Nyachieo A. Efficacy of Lytic *Staphylococcus Aureus* Bacteriophage against Multidrug-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Mice. *J Infect Dev Ctries*. 2016; 10: 1208–13. DOI: 10.3855/jidc.7931.
28. Sharma-Kuinkel BK, Zhang Y, Yan Q, Ahn SH, Fowler VG. Host Gene Expression Profiling and In Vivo Cytokine Studies to Characterize the Role of Linezolid and Vancomycin in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Murine Sepsis Model. *PLoS ONE*. 2013; 8: e60463. DOI: 10.1371/journal.pone.0060463.
29. Gordon O, Dikeman DA, Ortines RV, Wang Y, Youn C, Mumtaz M, et al. The Novel Oxazolidinone TBI-223 Is Effective in Three Preclinical Mouse Models of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infection. *Microbiol Spect*. 2022; 10: e02451-21, DOI: 10.1128/spectrum.02451-21.
30. Fujiki J, Nakamura T, Nakamura K, Nishida K, Amano Y, Watanabe Y, et al. Biological properties of *Staphylococcus virus* –SA012 for phage therapy. *Scientific reports*. 2022; 12 (1): 21297. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25352-6>.
31. Plumet L, Ahmad-Mansour N, Dunyach-Remy C, Kissa K, Sotto A, Lavigne J-P, et al. Bacteriophage Therapy for *Staphylococcus Aureus* Infections: A Review of Animal Models, Treatments, and Clinical Trials. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 907314. DOI: 10.3389/fcimb.2022.907314.

КОМПЛЕКСНОЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТОВ НА БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

А. А. Загоскин¹, Р. А. Авакова¹, Л. Ф. Резвых¹, М. В. Захарова², Э. К. Мубаракшина¹, Р. А. Иванов¹, М. О. Нагорных^{1,2}✉

¹ Научно-технологический университет «Сириус», Сочи, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов Российской академии наук, Пущино, Россия

Широкое использование антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве значительно ускорило темпы возникновения бактерий со множественной устойчивостью к антибиотикам. Поскольку к традиционным антибиотикам довольно быстро возникает резистентность, одним из перспективных направлений является разработка альтернативных антимикробных препаратов, обладающих иными механизмами действия на бактерии. Ферменты с бактерицидным действием могут быть одним из вариантов таких антибактериальных средств. Целью работы было получить комбинированные препараты рекомбинантных белков, активных в отношении бактерий и их биопленок. С помощью подходов генной инженерии были получены растворимые формы пяти рекомбинантных белков. Два из них обладают бактериолитическим эффектом (эндолизины LysK и PM9 из бактериофагов *Staphylococcus aureus*), остальные способны разрушать внеклеточный ДНК-матрикс у биопленок (две неспецифические нуклеазы NucA, а также ДНК-специфичная дезоксирибонуклеаза I). Показано, что природный эндолизин PM9 с усеченным каталитическим доменом обладает меньшей в 4 раза бактериолитической эффективностью по сравнению с полноразмерным вариантом LysK. С помощью сравнительного анализа выявлена в 1,5–2 раза большая эффективность неспецифических нуклеаз для разрушения бактериальных биопленок по сравнению с ДНК-специфичной дезоксирибонуклеазой I. Продемонстрировано, что одновременное использование эндолизина и нуклеаз оказывает синергичное антибактериальное действие и разрушает биопленки патогенной бактерии *Staphylococcus aureus*. Полученные результаты показывают перспективность разработки антибактериальных препаратов на основе рекомбинантных белков.

Ключевые слова: эндолизин, нуклеаза, биопленки, *Staphylococcus aureus*

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

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

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

Статья получена: 25.11.2024 **Статья принята к печати:** 15.12.2024 **Опубликована онлайн:** 23.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.064

COMPLEX ANTIBACTERIAL ACTION OF ENZYMES ACTING ON *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BIOFILMS

Zagoskin AA¹, Avakova RA¹, Rezvykh LF¹, Zakharova MV², Mubarakshina EK¹, Ivanov RA¹, Nagornykh MO^{1,2}✉

¹ Sirius University of Science and Technology, Sochi, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

The widespread use of antibiotics in medicine and agriculture has significantly accelerated the emergence rate of bacterial infections showing multiple antibiotic resistance. Since resistance to conventional antibiotics is developed rather quickly, designing alternative antimicrobial drugs with other mechanisms underlying their effects on bacteria is a promising. The enzymes possessing bactericidal activity may be one option for such antibacterial agents. The study aimed to produce the combination recombinant protein-based products active against bacteria and their biofilms. Soluble forms of five recombinant proteins were produced using the genetic engineering approaches. Two of these have a bacteriolytic effect (endolysins LysK and PM9 from the *Staphylococcus aureus* bacteriophages), the other are capable of disrupting extracellular DNA matrix in biofilms (two nonspecific nucleases NucA, as well as the DNA-specific deoxyribonuclease I). It has been shown that natural endolysin PM9 with the truncated catalytic domain shows 4 times lower bacteriolytic efficacy compared to the full-size LysK version. Comparative analysis revealed 1.5–2 times higher efficacy of nonspecific nucleases in terms of bacterial biofilm disruption compared to the DNA-specific deoxyribonuclease I. It has been shown that simultaneous use of endolysins and nucleases has a synergistic antibacterial effect and disrupts biofilms of the pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*. The findings show the prospects of developing the recombinant protein-based antibacterial drugs.

Keywords: endolysin, nuclease, biofilms, *Staphylococcus aureus*

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

Author contribution: Zagoskin AA, Mirzoyan RA — creating genetic constructs, chromatographic purification of recombinant proteins; Rezvykh LF — creating genetic constructs; Zakharova MV, Mubarakshina EK — selection of condition for recombinant protein production, experiments on production involving various *E. coli* strains; Nagornykh MO — study concept, genetic construct design, manuscript writing; Ivanov RA — general management.

DOI: 10.24075/brsmu.2024.064

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

Received: 25.11.2024 **Accepted:** 15.12.2024 **Published online:** 23.12.2024

Резистентность патогенных бактерий к лекарственным препаратам стремительно растет, превращаясь в глобальную проблему мировой системы здравоохранения. По последним данным Всемирной организации здравоохранения, количество антимикробных лекарственных средств на

разных этапах разработки возросло с 80 (2021 г.) до 97 (2023 г.), тем не менее возникает вопрос о создании новых, инновационных средств для лечения инфекционных заболеваний, вызванных антибиотикорезистентными штаммами, которые могли бы дополнить существующие

антибиотики, теряющие свою эффективность в результате широкого применения [1].

Одним из таких вариантов могут стать препараты на основе ферментов, обладающих антибактериальным действием. На сегодняшний день широко известны бактериолитические ферменты бактериофагов (эндолизины), которые вызывают лизис патогенных бактерий и могут быть использованы как терапевтические молекулы [2]. Эндолизины — это ферменты, которые кодируют в своих геномах бактериофаги и используют их для лизиса бактериальной клетки во время вирусной инфекции. Поскольку бактериофаги есть у всех бактерий и их разнообразие велико, их эндолизины являются очень перспективным классом бактериолитических ферментов. В настоящее время существует большое количество научных исследований и разработок антибактериальных препаратов на основе этих ферментов на доклинических и клинических стадиях испытаний [3]. Эндолизины как терапевтические вещества часто обладают более широким спектром специфичности, чем фаги, и их специфичность обычно проявляется на уровне рода или вида. Избирательность эндолизинов в отношении бактериальных мишеней обусловлена их доменами, связывающими клеточную стенку, которые обнаруживают и связывают рецепторы независимо от конкретного субстрата в клеточной стенке мишени. Так, за специфичное узнавание и связывание отвечает CBD-домен (cell wall binding domain), расположенный обычно на С-конце молекулы эндолизина. По этой причине грамтрицательные лизины имеют более широкий спектр мишеней, в то время как грамположительные часто имеют узкий спектр хозяев [4]. За каталитическую активность отвечает каталитический CD-домен (catalytic domain), а также его активность может быть усилена присутствием амидазного домена [5]. Еще одним преимуществом бактериолитических ферментов перед традиционными антибиотиками является отсутствие возникновения резистентности у бактерий, а также возможность воздействия на разные химические связи внутри клеточной стенки. Однако эндолизины не могут эффективно разрушать устойчивые биопленки, которые образуют многие патогенные бактерии, что является одной из существенных проблем современной антибактериальной терапии. Биопленки являются сложной надклеточной структурой, которая стабилизируется многими связями между органическими молекулами [6]. Ферменты, разрушающие биопленки, также являются перспективным классом антибактериальных средств и различаются по типам ферментативной активности, в зависимости от того, на какой компонент биопленки они воздействуют [7]. В том числе для многих бактериальных биопленок характерен матрикс из внеклеточной ДНК, который могут разрушать нуклеазы. Ранее было показано, что дезоксирибонуклеаза I обладает такой активностью [8]. В связи с этим актуальны поиск и характеристика новых нуклеаз с антибактериальным действием. Применение бактериолитических ферментов и их комбинаций с ферментами, оказывающими разрушающее действие на биопленки, может позволить увеличить эффективность терапии бактериальных инфекций. Такой суммарный эффект был показан, например, для антибактериального действия против *Mycobacterium tuberculosis* [9]. Ферменты, разрушающие связи внутри биопленок, могут стать одним из компонентов комплексного антибактериального препарата вместе с эндолизинами, оказывая синергическое антибактериальное действие.

Поэтому разработка подобных комбинированных антибактериальных препаратов на основе рекомбинантных белков, обладающих разной каталитической активностью, является перспективным направлением. Эффективность таких препаратов наиболее высока против грамположительных бактерий, в частности метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), борьба с которым в клинике является одной из приоритетных задач [10].

Цель этой работы — провести сравнительный анализ антибактериального действия нескольких комбинаций ферментов, обладающих бактериолитическим действием либо активностью в отношении бактериальных биопленок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование плазмид

Все плазмиды, используемые в этой работе, были получены с использованием рестриктазно-лигазного метода клонирования ДНК. Последовательности ДНК генов эндолизинов и ДНК-нуклеаз были синтезированы *de novo* с проведением кодон-оптимизации нуклеотидных последовательностей для *E. coli* (IDT, <https://www.idtdna.com/>). Нуклеотидные последовательности были взяты из баз данных PhaLP (www.phalp.org) и Uniprot (www.uniprot.org). Амплификацию всех последовательностей ДНК проводили с использованием высокоточной полимеразы Pfu (Takara, США), согласно протоколу производителя. Клонирование целевых генов проводили в вектор pET21a (Novagen, Англия), а также в набор векторов со вспомогательными полипептидами [11] на основе pET28a (Novagen, Англия) по сайтам рестрикции NdeI и NotI в ферментативной реакции с двумя соответствующими эндонуклеазами рестрикции («Сибэнзим», Россия) в течение 1 ч при 37 °С. Очистку ДНК фрагментов осуществляли после электрофореза из агарозного геля, с использованием коммерческого набора GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США). Далее очищенные фрагменты ДНК смешивали и использовали в реакции лигирования с ферментом T4 ДНК лигазой (NEB, США) в течение 30 мин при комнатной температуре. После чего трансформировали компетентные клетки *E. coli* 10G (Lucigen, Англия) при помощи электропорации (Bio-Rad, США) по протоколу производителя прибора. Из клонов, содержащих корректные вставки, выделяли плазмидную ДНК и подтверждали корректность в реакции секвенирования по методу Сэнгера.

Наработка рекомбинантных белков в *E. coli*

Наработку белков проводили в следующих штаммах, предназначенных для наработки рекомбинантных белков: *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Англия), *E. coli* Rosetta gami 2 (Novagen, Англия), *E. coli* SHuffle T7express (NEB, США). Так, плазмидами, содержащими гены нуклеаз или эндолизинов, трансформировали выбранный штамм при помощи термического шока и засеивали трансформационной смесью (100 мкл) жидкую среду LB в пробирках (3–5 мл) с селективными антибиотиками. Инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании 180 об./мин. Далее пересевали выросшую культуру в соотношении 1 : 200 в колбы, содержащие требуемое количество культуральной среды LB (100–500 мл) с селективными антибиотиками. Наравали клеточную культуру до оптической плотности $OD_{600} = 0,5–0,6$ на шейкере при 180 об./мин на 37 °С. После достижения нужной оптической плотности

охлаждали культуру на льду 10 мин, добавляли индуктор до конечной концентрации 1 мМ ИПТГ, инкубировали при разных температурах (18 °С и 37 °С) и перемешивании 180 об./мин в течение 18 ч (18 °С) либо 6 ч (37 °С). Далее бактериальные клетки осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4000 g и 4 °С.

Для оценки степени растворимости полученного белка осажденные клетки переводили в буфер А для разрушения (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) и разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Qsonica Q700 (Qsonica, США) до просветления клеточной суспензии на льду (импульсы УЗ 3 с, охлаждение 6 с, 40 циклов). Осаждали разрушенные клетки при помощи центрифугирования (17 000 g) в течение 20 мин при 4 °С. Далее отбирали пробы супернатанта, содержащего растворимую форму целевого белка, а осадок, содержащий агрегированную форму, растворяли в 2М мочеvine для дальнейшего электрофоретического анализа. Разделение белков проводили при помощи электрофореза в ПААГ (10%) в денатурирующих условиях по стандартным методикам. После окраски в One-Step Blue® (Biotium, США) и отмывки от красителя гели фотографировали и проводили количественную оценку распределения белков между растворимой и нерастворимой формами. Денситометрический анализ гелей проводили с помощью приложения Image Lab (Bio-Rad, США).

Очистка белков с использованием аффинной хроматографии

Надосадочную жидкость после ультразвукового разрушения биомассы и центрифугирования клеточного дебриса фильтровали через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Таким образом получали препарат для хроматографической очистки, содержащий растворимую фракцию белков в буфере А (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,3 М NaCl; 0,005 М имидазола) для нанесения на хроматографический сорбент IMAC (Bio-Rad® Nuviatm IMAC Resin, США). Белок элюировали хроматографическим буфером В (50 мМ Трис-НСl pH 7,5; 0,5 М имидазола). При необходимости препарат, полученный после очистки с использованием IMAC, концентрировали с использованием центрифужного концентратора Vivaspin® 500 (Sartorius, Германия) (размером пор 3,5 кДа) в 30–50 раз. При необходимости, далее препарат очищенного белка обрабатывали ТЕV-протеазой согласно рекомендациям производителя, в течение ночи при 4 °С, а далее проводили повторную хроматографическую очистку, но собирали уже фракцию, не связанную с сорбентом, которая содержала очищенный эндолизин. Полученный препарат сразу использовали для оценки противобактериальной активности.

Проверка антибактериальной активности полученных белковых препаратов против *Staphylococcus aureus*

Колонию *Staphylococcus aureus* скалывали и помещали в 3–5 мл жидкой среды LB и инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании 180 об./мин. Далее 1 мл ночной культуры переносили в пробирку, центрифугировали в течение 3 мин при 4000 g, клеточный отсадок ресуспендировали в PBS, повторяли процедуру 3 раза. Отмытые клетки разводили в PBS до 0,1 при OD₆₀₀, 100 мкл разведенных клеток помещали в 96 луночный планшет и к ним добавляли 100 мкл исследуемого белка,

либо 100 мкл PBS в положительном контроле. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при постоянном помешивании 200 об./мин. После инкубирования клетки разводили в 100 раз в PBS, после чего 100 мкл полученной смеси высевали на агаризованные чашки без антибиотика. Чашки инкубировали в течение ночи при 37 °С. На следующий день проводили подсчет колоний на чашках с контролем и исследуемыми белками, расчет антибактериальной активности проводили по следующей формуле:

$$X = 100 - ((\text{КОЕ образца} \times 100) / \text{КОЕ контроля}),$$

где X — антибактериальная активность исследуемого белка, выраженная в %; КОЕ образца — количество колониеобразующих единиц на чашке после инкубирования клеток с исследуемым белком; КОЕ контроля — количество колониеобразующих единиц на чашке без обработки исследуемым белком.

Для оценки антибиопленочной активности исследуемых белков колонию *S. aureus* помещали в 3–5 мл жидкой среды TBS (без глюкозы) и инкубировали в течение 12–14 ч при 37 °С и перемешивании 180 об./мин. Далее ночную культуру разводили в TBS с добавлением 1% глюкозы до значения 0,08 при OD₆₀₀, после чего помещали по 200 мкл клеточной суспензии в 96 луночный планшет и инкубировали при 37 °С без перемешивания в течение 48 ч. После инкубирования трижды промывали полученные биопленки PBS, используя пипетирование. Таким образом избавлялись от планктонных клеток. Далее к биопленкам добавляли по 200 мкл исследуемых ферментов и инкубировали в течение 2 ч при 37 °С без перемешивания. После инкубирования трижды отмывали лунки PBS, используя пипетирование и просушивали в течение 5 мин при комнатной температуре. Для окрашивания оставшихся биопленок добавляли по 200 мкл 0,1%-го раствора кристаллического фиолетового и инкубировали в течении 15 мин при комнатной температуре. После окрашивания клетки снова трижды отмывали PBS, используя пипетирование, и просушивали в течение 45 мин. Далее добавляли по 200 мкл 33% уксусной кислоты, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Анализ проводили с использованием прибора Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific, США), измеряя оптическую плотность при OD₆₀₀. Эффективность разрушения биопленок рассчитывали относительно контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение комбинированных антибактериальных препаратов на основе ферментов — перспективный способ совместить разные ферментативные активности против бактериальных патогенов в одном лекарственном средстве. Это позволяет не только увеличить эффективность антимикробного действия, в том числе против биопленок, но и снизить дозу препарата. Для получения отдельных компонентов такого препарата необходимо получить гомогенные белковые препараты для каждого фермента. В нашей работе мы получили отдельные препараты рекомбинантных белков, а далее тестировали их антибактериальную активность против отдельных клеток и биопленок *Staphylococcus aureus*. Общая экспериментальная схема исследования представлена на рис. 1. Первым этапом работы было получение генетических конструкций, кодирующих следующие белки: 1) эндолизин LysK стафилококкового фага K; 2) ранее неаннотированный эндолизин PM9_074 стафилококкового фага PM9 с усеченным каталитическим

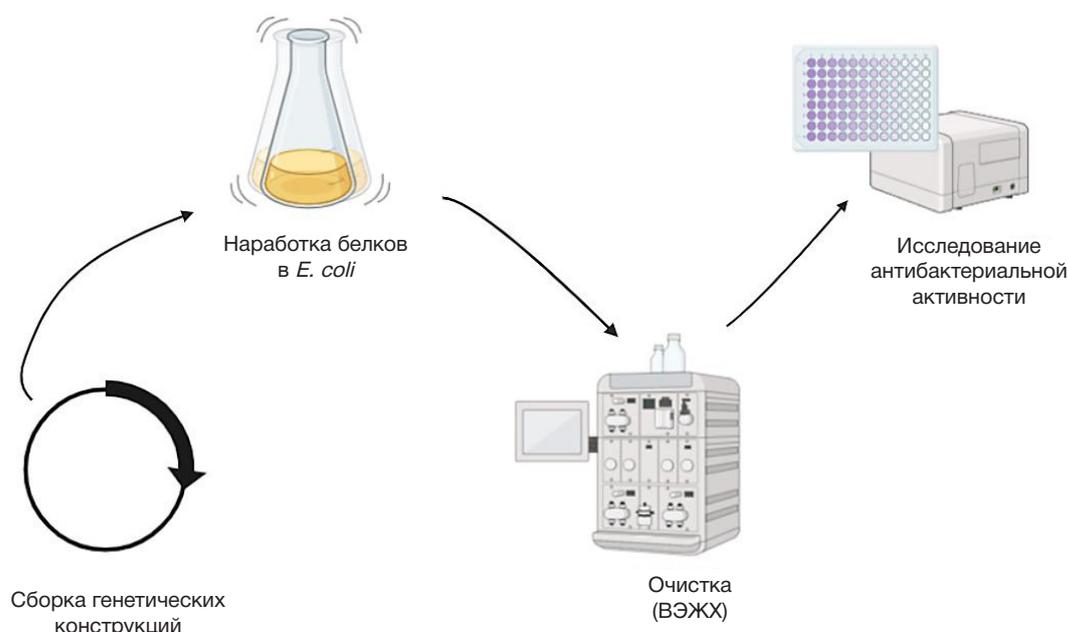


Рис. 1. Схема экспериментальной работы по получению препаратов энзимотиков и проверке их антибактериальной активности

доном; 3) дезоксирибонуклеаза I человека (ДНКаза I); 4) неспецифическая нуклеаза NucA1 из *Serratia marcescens*; 5) неспецифическая нуклеаза NucA2 из *Anabaena sp.*

Все нуклеотидные последовательности были оптимизированы по кодоновому составу для экспрессии в *Escherichia coli* и кодировали в своем составе гистидиновый таг на N-конце для последующей аффинной хроматографической очистки. После синтеза генов *de novo* они были клонированы в плазмидный вектор pET21a для последующей экспрессии генов, кодирующих целевые рекомбинантные белки. Полученными генетическими конструкциями были трансформированы клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3), который предназначен для наработки рекомбинантных белков. После индукции и инкубации проводили оценку степени наработки целевых белков в

растворимой и нерастворимой форме. Нарработка белков при 37 °С и при 20 °С не дала хороших результатов, поскольку все целевые ферменты образовывали нерастворимые агрегаты (тельца включения). Замена штамма на два альтернативных *E. coli Rosetta gami 2*, *E. coli SHuffle T7express* не дала какого-либо положительного результата (табл. 1).

Поэтому далее для получения растворимых форм белков было решено проводить наработку со вспомогательными полипептидами, потенциально увеличивающими растворимость белков и их корректное сворачивание в пространстве [12]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие выбранные эндолизин и нуклеазы, были клонированы в ряд сконструированных нами ранее векторов, содержащих различные вспомогательные

Таблица 1. Оценка наработок рекомбинантных эндолизинов и нуклеаз в штаммах *E. coli*

Температурный режим биосинтеза белка	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>Escherichia coli</i> Rosetta gami 2	<i>Escherichia coli</i> SHuffle T7express
pET21-LysK			
37 °С (6 ч)	H	H	H
18 °С (16–18 ч)	H	H	P+
pET21-PM9			
37 °С (6 ч)	H	H	H
18 °С (16–18 ч)	H	P+	P+
pET21-DnaseI			
37 °С (6 ч)	H	H	H
18 °С (16–18 ч)	H	H	H
pET21-NucA1			
37 °С (6 ч)	H	H	H
18 °С (16–18 ч)	H	H	H
pET21-NucA2			
37 °С (6 ч)	H	H	H
18 °С (16–18 ч)	H	H	P+

Примечание: P — растворимый, H — нерастворимый, «+» — степень наработки растворимого белка.

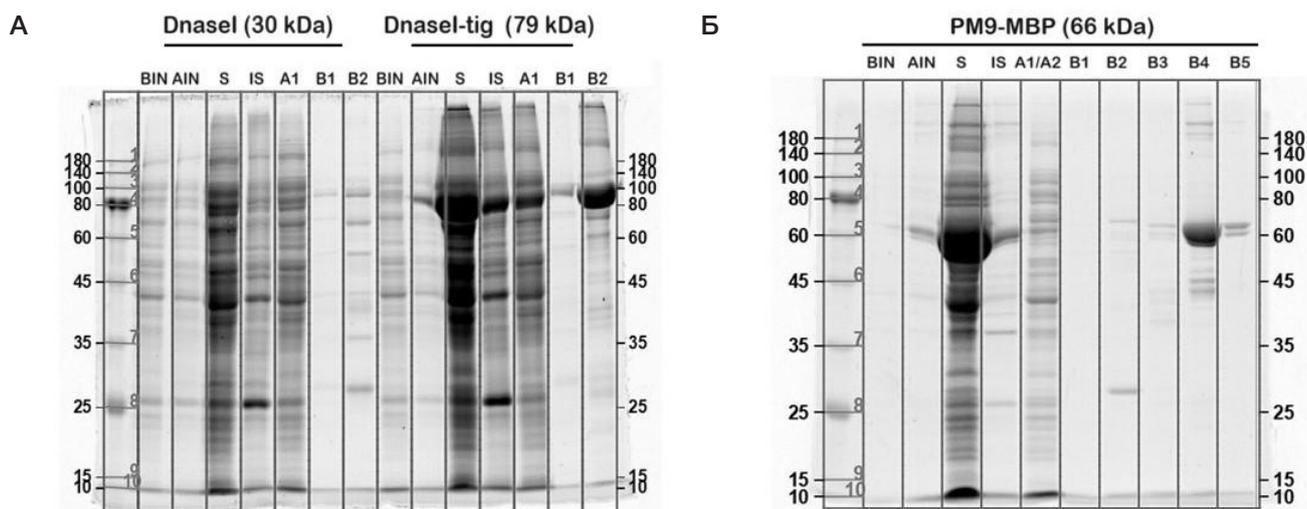


Рис. 2. Стратегия получения рекомбинантных белков, склонных к агрегации при помощи наработки в виде химерной молекулы, на N-конце которой находится вспомогательный полипептид, повышающий растворимость целевого белка. В частности, электрофореграмма в ПААГ демонстрирует примеры влияния вспомогательного полипептида TIG на растворимость ДНКазы I (А) и вспомогательного полипептида MBP на растворимость эндолизина PM9 (Б)

полипептиды. Мы уже использовали такой подход на практике для получения гомогенного препарата ингибитора рибонуклеаз в растворимой форме [13]. Система представляет собой набор плазмид, каждая из которых содержит определенный хелперный полипептид и сайт расщепления TEV-протеазы на N-конце нуклеотидной последовательности целевого гена. В результате наработки химерного белка с использованием такого вектора повышается вероятность получения растворимого белкового препарата. В системе использованы следующие вспомогательные полипептиды: MBP, GST, TIG, YrhB, PpiB, TRX, TSF, SUMO, FH8. Проверку наработки рекомбинантных белков с использованием этого набора плазмид проводили также в штамме *E. coli* BL(DE3) при двух температурных режимах, как было описано ранее. Продукция белка при 37 °C независимо от присутствия партнерского полипептида происходила в основном с образованием нерастворимых агрегатов, в отличие от продукции белка при 18 °C, где отдельные вспомогательные полипептиды

существенно повысили выход растворимой формы целевых белков (рис. 2, табл. 2).

Таким образом, получили наиболее продуктивные комбинации «вспомогательный полипептид-целевой белок» и удалось подобрать подходящие условия наработки, которые помогли получить целевые белки в растворимой форме. Наиболее высокие выходы эндолизинов и нуклеаз удалось получить при использовании вспомогательных полипептидов MBP и TIG (табл. 2).

Далее была изучена антибактериальная активность полученных ферментов, а также их способность разрушать бактериальные биопленки *Staphylococcus aureus* как в виде монопрепаратов, так и в виде комбинаций ферментативных активностей. Сперва мы сравнили активность двух эндолизинов в отношении бактериальных клеток (рис. 3). Идентичный узнающий домен обоих эндолизинов позволяет сравнивать каталитические активности этих молекул в прямом эксперименте. Результаты демонстрируют, что оба фермента проявляют

Таблица 2. Оценка наработок рекомбинантных эндолизинов и нуклеаз в штаммах *E. coli*

Температурный режим биосинтеза белка	Степень растворимости белка	Выход белка после очистки (мг/л)
pET28MBP-LysK		
37 °C (6 ч)	H	
18 °C (16–18 ч)	P+	2,55
pET28MBP-PM9		
37 °C (6 ч)	H	
18 °C (16–18 ч)	P++	4,95
pET28TIG-DnaseI		
37 °C (6 ч)	H	
18 °C (16–18 ч)	P+++	7,4
pET28MBP-NucA1		
37 °C (6 ч)	H	
18 °C (16–18 ч)	P+++	6,7
pET28TIG-NucA2		
37 °C (6 ч)	H	
18 °C (16–18 ч)	P++	4,8

Примечание: P — растворимый, H — нерастворимый, «+» — степень наработки растворимого белка.

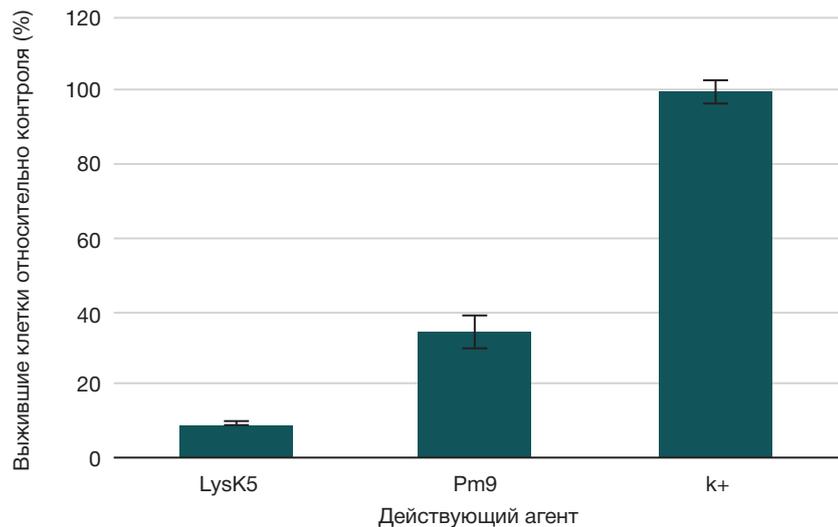


Рис. 3. Каталитическая активность двух эндолизинов против клеточной стенки бактерий *Staphylococcus aureus*. Оба рекомбинантных фермента обладают антибактериальной активностью, разрушая клеточную стенку. Эндолизин LysK, имеющий полноразмерный каталитический домен, обладает существенно большей антибактериальной активностью в отношении грамположительного патогена *Staphylococcus aureus*, по сравнению с эндолизин PM9, имеющим усеченный каталитический домен

антибактериальное действие и способны вызывать лизис клеток *Staphylococcus aureus*, однако эндолизин бактериофага PM9 с усеченным каталитическим доменом все же обладает меньшей активностью (почти в четыре раза ниже относительно эндолизина LysK). По-видимому, такие варианты эволюционно менее выигрышны для вирусов, поэтому их количество в геномах фагов существенно меньше, чем количество полноразмерных вариантов генов эндолизинов. Возможно, что гены, кодирующие такие молекулы, являются «эволюционным мусором» в геномах бактериофагов, но их точная биологическая роль пока не очень ясна. Эти данные указывают на то, что для создания эффективных антибактериальных препаратов все же имеет смысл выбирать эндолизин с полноценным каталитическим доменом (либо несколько молекул с разными по специфичности каталитическими доменами).

В качестве следующего этапа мы проверили три полученных нуклеазы на способность разрушать биопленки *Staphylococcus aureus* за счет разрушения матрикса, состоящего из экстраклеточной ДНК. Ранее было показано, что дезоксирибонуклеаза I способна разрушать бактериальные биопленки [8], однако для неспецифических нуклеаз таких исследований не проводилось. Все три нуклеазы, выделенные нами в

виде препаратов рекомбинантных белков, а именно дезоксирибонуклеаза I человека, неспецифическая нуклеаза NucA1 из *Serratia marcescens* и неспецифическая нуклеаза NucA2 из *Anabaena sp.*, могут деградировать бактериальные биопленки (рис. 4). Из полученных результатов видно, что обе неспецифические нуклеазы имеют более высокую эффективность разрушения биопленок, что, возможно, связано с механизмом их действия. Их большая нуклеазная активность стала причиной широкого использования неспецифических нуклеаз для научных и биотехнологических задач, в частности разработки коммерческого препарата *Benzonase* от компании *Merck*. Таким образом, неспецифические нуклеазы могут подойти для создания антибактериальных препаратов, обладающих способностью разрушать биопленки. Поэтому при дальнейшей разработке комплексного антибактериального препарата рационально ориентироваться на физико-химические свойства таких ферментов, а также на результаты доклинических исследований. Фермент ДНКазы I хоть и проявляет меньшую активность, но плюсом является его происхождение, что потенциально минимизирует иммуногенность препарата. Также необходимо отметить, что уже существуют коммерческие препараты на основе этого рекомбинантного

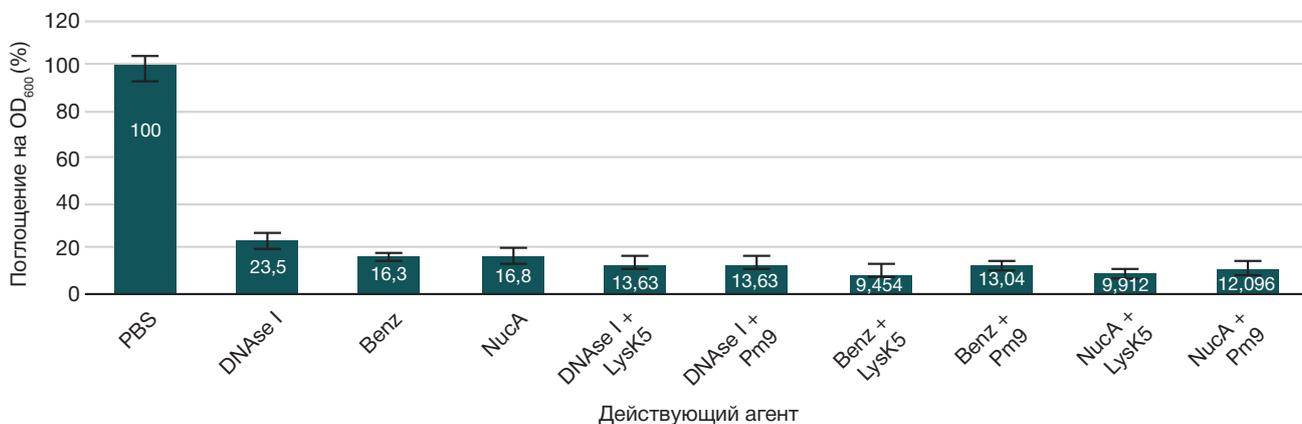


Рис. 4. Разрушение бактериальных биопленок *Staphylococcus aureus* препаратами рекомбинантных нуклеаз, а также комбинированными препаратами, совмещающими разные каталитические активности (эндолизин + нуклеаза). Неспецифические нуклеазы обладают большей активностью в отношении разрушения бактериальных биопленок по сравнению с ДНКазой I. Комбинации ферментов с разной специфичностью в одном препарате усиливают антибактериальное действие

фермента (Dornase Alfa и его аналоги), которые уже имеют терапевтическое применение.

Последней и основной задачей настоящей работы была проверка эффективности антибактериального действия комбинированного препарата, сочетающего минимум две разные каталитические активности в отношении биопленок *Staphylococcus aureus*. Так, мы планировали протестировать разные комбинации из двух молекул эндолизинов и трех нуклеаз. В наших условиях наилучшие результаты показали комбинации полноразмерного эндолизина LysK и нуклеаз, что можно объяснить лучшей лизирующей активностью этого фермента, по сравнению с эндолизином PM9 с усеченным каталитическим доменом (рис. 4). Все три используемые нуклеазы были активны в комбинированном препарате, однако наилучшие результаты показали неспецифические нуклеазы. Возможно, это связано с экспериментальными условиями и при подборе оптимального реакционного буфера ДНКазы I тоже дала бы сравнимую эффективность. Однако разница в механизмах ферментативной активности может играть значительную роль при практическом применении препаратов. Таким образом, неспецифические нуклеазы могут быть использованы в комбинированных антибактериальных препаратах на основе рекомбинантных белков, либо могут потенцировать действие антибиотиков при их действии на бактериальные биопленки.

Резюмируя полученные результаты, мы подобрали условия наработки и хроматографической очистки двух эндолизинов (LysK и PM9), обладающих активностью против *Staphylococcus aureus*, а также трех нуклеаз (NucA1, NucA2 и DNase I), способных разрушать ДНК-матрикс бактериальных биопленок. Для этого мы использовали скрининговый подход по наработке ферментов в комбинации с желперными полипептидами. Далее мы продемонстрировали антибактериальную активность этих ферментов, а также их комплексное действие против биопленок *Staphylococcus aureus*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Текущий кризис антибиотикорезистентности, вызванный широким использованием антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве, вынуждает искать альтернативные терапевтические средства для борьбы с патогенными бактериями. Такие препараты можно было бы использовать как поддержку для терапии традиционными антибиотиками либо как монотерапию, исключая применение антибиотиков в ряде случаев. Одним из перспективных направлений является разработка антибактериальных препаратов на основе рекомбинантных белков, обладающих бактериолитическим действием [14]. Наиболее интересны эндолизины — бактериолитические белки, при помощи которых бактериофаги лизируют зараженные бактериальные клетки во время вирусной инфекции. Эндолизины имеют модульную структуру и обычно содержат два или три домена, отвечающие за распознавание определенных бактерий, а также каталитическую активность в отношении компонентов клеточной стенки. В настоящее время эти молекулы довольно хорошо изучены и на их основе пробуют разрабатывать антимикробные препараты — энзиботики [14]. По мере открытия и описания геномов новых бактериофагов, копятся данные по неохарактеризованным вирусным белкам, в том числе по эндолизинам. Часть этих эндолизинов имеет усеченные каталитические

домены, биологический смысл этого не совсем понятен. В этой работе мы сравнили два эндолизина, кодируемые двумя бактериофагами *Staphylococcus aureus* K и PM9. Один из них хорошо известен и имеет полноценную трехдоменную структуру, включающую каталитические домены (пептидазный и амидазный), а также узнающий домен [15], а второй является неохарактеризованным эндолизином со значительно усеченным каталитическим доменом и идентичным по последовательности связывающим доменом. При наработке в гетерологичной системе *E. coli* оба эндолизина агрегируют и формируют тельца включения. Для получения функциональных препаратов этих белков, обладающих активностью, мы воспользовались методологическим подходом, в котором растворимость целевого рекомбинантного белка обеспечивает вспомогательный полипептид, который находится на N-конце химерной белковой молекулы (рис. 2, табл. 2). После успешной наработки химерных молекул в растворимой форме вспомогательный пептид отщепляли при помощи TEV-протеазы и использовали белки для постановки тестов на антимикробную активность против клеток *Staphylococcus aureus*. Наши результаты указывают на то, что эндолизин фага PM9 с усеченным каталитическим доменом проявляет существенно более низкую активность в отношении клеток *Staphylococcus aureus* (рис. 3). При этом оба эндолизина имеют полностью идентичный по аминокислотному составу узнающий домен, что нивелирует разницу при связывании молекул с рецепторами бактериальных клеток. По причине низкой активности использование таких ферментов, несмотря на их большую компактность и возможные выгодные отличия физико-химических свойств от полноразмерных молекул, является неоправданным. Поэтому для разработки препаратов на основе эндолизинов нужно выбирать варианты с полноразмерными доменами. Исследования и разработки в области комбинаторной инженерии эндолизинов демонстрируют потенциал этих белков для применения в качестве антибактериальных средств [4, 14]. Эндолизины с полноценным каталитическим доменом ожидаемо обладают большей антибактериальной активностью, нежели варианты с усеченным каталитическим доменом. При этом связывающий домен таких усеченных вариантов эндолизинов полностью функционален, что таргетирует эти молекулы на клеточные рецепторы бактерий во время инфекции, но биологическая роль этого пока не очень понятна. Можно предположить, что такие формы молекул эндолизинов являются либо эволюционно-переходными вариантами, либо рудиментарными ферментами, от которых жизненный цикл вируса уже не очень зависит, но в геноме вирусов они сохранились.

Однако необходимо отметить, что антибактериальное действие эндолизинов является ограниченным в отношении бактериальных биопленок, которые часто образуют патогенные бактерии. Поскольку структура бактериальных биопленок стабилизируется внеклеточным матриксом, состоящим из различных биоорганических молекул, то связи между ними являются потенциальной мишенью для разрушения биопленки [6]. Одним из компонентов такого матрикса биопленок является внеклеточная ДНК, которая образует устойчивые структуры, стабилизирующие биопленку [16, 17]. Ранее было показано, что каталитическая активность дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I), гидролизующая фосфодиэфирные связи между субъединицами нуклеиновых кислот, может обеспечивать разрушение бактериальных биопленок,

которые образуются при инфекции [8]. Мы решили проверить на аналогичную активность еще две нуклеазы с неспецифической активностью против ДНК и РНК — нуклеазу NucA из бактерии *Serratia marcescens* и нуклеазу NucA из *Anabaena sp.* и сравнить их эффективность с ДНКазой I человека. Для этого мы получили все три нуклеазы в виде препаратов гомогенных белков, а поскольку эти белки также агрегируют при наработке в *E. coli*, мы провели скрининг и подобрали подходящие вспомогательные белки для наработки нуклеаз в растворимой форме (рис. 2, табл. 2). Выделенные белки показывают активность против биопленок *Staphylococcus aureus*, притом обе неспецифические нуклеазы NucA1 из *Serratia marcescens* и NucA2 из *Anabaena sp.* наиболее активны среди трех в тесте по разрушению биопленок (рис. 4). Таким образом, для разработки антибактериальных препаратов потенциально могут подойти любые нуклеазы, при этом можно ориентироваться на более подходящие физико-химические свойства ферментов и профиль безопасности на основе результатов доклинических исследований. Возможно, в таком препарате человеческая ДНКаза I предпочтительна, несмотря на меньшую каталитическую активность, поскольку на нее иммунный ответ будет незначительный, в отличие от рекомбинантных белков чужеродной природы. К тому же, на основе этого фермента уже есть коммерческие препараты для облегчения симптомов муковисцидоза, а также бактериальных осложнений после вирусных инфекций [18].

Совмещение двух (или более) каталитических активностей в одном антибактериальном препарате позволяет воздействовать на разные структуры бактериальной биопленки при инфекции [19]. Так, ферменты, разрушающие внеклеточные структурные компоненты биопленок, могут предоставить доступ к внутренним слоям бактериальных клеток бактериолитическим ферментам и усилить эффективность их действия на отдельные клетки бактерий [9]. Далее мы попробовали скомбинировать эндолизин с нуклеазами, которые мы получили в ходе нашей работы. Мы оценивали действие этих комбинированных препаратов в отношении биопленок *Staphylococcus aureus*, а также оценивали их литическую активность против клеток этого грамположительного бактериального патогена. Предсказуемо лучший результат при совместном действии дали пары, где полноразмерный

эндолизин LysK работал в комбинации с одной из трех нуклеаз (рис. 4). Комбинации эндолизина с усеченным каталитическим доменом и нуклеаз не дали столь высоких результатов, что было ожидаемо, исходя из результатов тестирования антимикробного действия этого эндолизина против клеток *Staphylococcus aureus* (рис. 3). Можно заключить, что использование двух (или более) каталитических активностей, которые обеспечивают разные ферменты в одном антибактериальном препарате, является перспективным при лечении бактериальных инфекций, осложненных образованием биопленок. Использование нуклеаз (как неспецифических, так и ДНК-специфических) в подобных препаратах видится оправданным, поскольку их активность существенно деградирует биопленки бактерий, обеспечивая потенцирующий эффект антибактериального действия как эндолизинов, так и традиционных антибиотиков.

Выводы

Результаты настоящей работы демонстрируют возможность получения комбинированных препаратов антибактериальных ферментов на основе эндолитических ферментов бактериофагов и ферментов, деградирующих бактериальные биопленки. Мы показали, что эндолизин PM9 с усеченным каталитическим доменом проявляет меньшую бактериолитическую активность, чем эндолизин LysK с полноразмерным каталитическим доменом, а неспецифические нуклеазы обладают лучшей разрушающей активностью в отношении бактериальных биопленок. Мы также провели сравнительный анализ эффективности действия нескольких комбинаций ферментов против бактерий *Staphylococcus aureus* и их биопленок. Результаты показывают синергическое антимикробное действие очищенных препаратов рекомбинантных эндолизинов LysK и PM9, а также неспецифических (NucA1 и NucA2) и ДНК-специфических (DNase I) нуклеаз. В перспективе такой подход к инженерии комбинированных препаратов, включающих в себя два или три разных вида каталитической активности, поможет получать терапевтические средства с усиленными антибактериальными свойствами против микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, которые склонны к образованию биопленок при инфекциях.

Литература

1. Naghavi Mohsen, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*. 2024; 404 (10459), 1199–226.
2. Liu H, Hu Z, Li M, et al. Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria. *J Biomed Sci*. 2023; 30, 29. DOI:10.1186/s12929-023-00919-1.
3. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Seyed Hosseini E, Moniri R. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31: Available from: 10.1128/cmr.00071-17. <https://doi.org/10.1128/cmr.00071-17>
4. Wang Y, Wang X, Liu X, Lin B. Research Progress on Strategies for Improving the Enzyme Properties of Bacteriophage Endolysins. *J Microbiol Biotechnol*. 2024; 34: 1189–96. Available from: <https://doi.org/10.4014/jmb.2312.12050>.
5. Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola OI, Ragab S, Lynch S, Oduselu TJ, et al. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (2): 124. DOI: 10.3390/antibiotics10020124. PMID: 33525684; PMCID: PMC7912344.
6. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol*. 2022; 20: 608–620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
7. Wang S, Zhao Y, Breslawec AP, et al. Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *npj Biofilms Microbiomes*. 2023; 9: 63 Available from: <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>.
8. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo)*. 2012; 65 (2): 73–7. DOI: 10.1038/ja.2011.113. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.
9. Bartlett HP, Dawson CC, Glickman CM, Osborn DW, Evans CR, Garcia BJ, et al. Targeting intracellular nontuberculous mycobacteria and *M. tuberculosis* with a bactericidal enzymatic cocktail. *Microbiol Spectr*. 2024; 12 (5): e0353423. DOI: 10.1128/spectrum.03534-23. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38534149; PMCID: PMC11064574.

10. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, et al. Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21: 380–395. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>.
11. Zakharova MV, Mubarakshina EK, Nagornykh MO. Construction of Expression Vectors for Efficient Production of Recombinant Proteins in *E. coli* for the Development of Therapeutic Drugs. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2024; 18: 254–62. Available from: <https://doi.org/10.1134/S1990750823600516>.
12. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.* 2014; 5: 63. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00063. PMID: 24600443; PMCID: PMC3928792.
13. Захарова М. В., Загоскин А. А., Иванов П. А., Нагорных М. О. Получение рекомбинантного ингибитора рибонуклеаз в *E. coli* для использования в синтезе мРНК in vitro. *Вестник РГМУ.* 2023; (6): 36–44. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.058.
14. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021; 13 (4): 680. DOI: 10.3390/v13040680. PMID: 33920965; PMCID: PMC8071259.
15. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2005; 187 (20): 7161–4. DOI: 10.1128/JB.187.20.7161-7164.2005. PMID: 16199588; PMCID: PMC1251611.
16. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 623–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/nmicro2415>.
17. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 2020; 28 (8): 668–81. DOI: 10.1016/j.tim.2020.03.016. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32663461.
18. Gustafson AM, Larrain CM, Friedman LR, Repkorwich R, Anidi IU, Forrest KM, et al. Novel management of pseudomonas biofilm-like structure in a post-pneumectomy empyema. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14: 1458652. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1458652. PMID: 39483118; PMCID: PMC11525003.
19. Quan Lin, Maokun Sheng, Yanjun Tian, Bing Li, Zhaodi Kang, Yingying Yang, et al. Antibiofilm activity and synergistic effects of DNase I and lysostaphin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Quality and Safety.* 2024; 8: fyae024. Available from: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyae024>.

References

1. Naghavi Mohsen, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet.* 2024; 404 (10459), 1199–226.
2. Liu H, Hu Z, Li M, et al. Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by Gram-positive bacteria. *J Biomed Sci.* 2023; 30, 29. DOI:10.1186/s12929-023-00919-1.
3. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Seyed Hosseini E, Moniri R. Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31: Available from: 10.1128/cmr.00071-17. <https://doi.org/10.1128/cmr.00071-17>
4. Wang Y, Wang X, Liu X, Lin B. Research Progress on Strategies for Improving the Enzyme Properties of Bacteriophage Endolysins. *J Microbiol Biotechnol.* 2024; 34: 1189–96. Available from: <https://doi.org/10.4014/jmb.2312.12050>.
5. Abdelrahman F, Easwaran M, Daramola OI, Ragab S, Lynch S, Oduselu TJ, et al. Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (2): 124. DOI: 10.3390/antibiotics10020124. PMID: 33525684; PMCID: PMC7912344.
6. Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20: 608–620. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
7. Wang S, Zhao Y, Breslawec AP, et al. Strategy to combat biofilms: a focus on biofilm dispersal enzymes. *npj Biofilms Microbiomes.* 2023; 9: 63 Available from: <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00427-y>.
8. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, et al. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. *J Antibiot (Tokyo).* 2012; 65 (2): 73–7. DOI: 10.1038/ja.2011.113. Epub 2011 Dec 14. PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.
9. Bartlett HP, Dawson CC, Glickman CM, Osborn DW, Evans CR, Garcia BJ, et al. Targeting intracellular nontuberculous mycobacteria and *M. tuberculosis* with a bactericidal enzymatic cocktail. *Microbiol Spectr.* 2024; 12 (5): e0353423. DOI: 10.1128/spectrum.03534-23. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38534149; PMCID: PMC11064574.
10. Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nat Rev Microbiol.* 2023; 21: 380–395. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00852-y>.
11. Zakharova MV, Mubarakshina EK, Nagornykh MO. Construction of Expression Vectors for Efficient Production of Recombinant Proteins in *E. coli* for the Development of Therapeutic Drugs. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B.* 2024; 18: 254–62. Available from: <https://doi.org/10.1134/S1990750823600516>.
12. Costa S, Almeida A, Castro A, Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Front Microbiol.* 2014; 5: 63. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00063. PMID: 24600443; PMCID: PMC3928792.
13. Zakharova MV, Zagoskin AA, Ivanov RA, Nagornykh MO. Preparation of a recombinant ribonuclease inhibitor in *E. coli* for use in mRNA synthesis in vitro. *Bulletin of RSMU.* 2023; (6): 34–41. DOI: 10.24075/brsmu.2023.058.
14. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses.* 2021; 13 (4): 680. DOI: 10.3390/v13040680. PMID: 33920965; PMCID: PMC8071259.
15. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2005; 187 (20): 7161–4. DOI: 10.1128/JB.187.20.7161-7164.2005. PMID: 16199588; PMCID: PMC1251611.
16. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 623–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/nmicro2415>.
17. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 2020; 28 (8): 668–81. DOI: 10.1016/j.tim.2020.03.016. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32663461.
18. Gustafson AM, Larrain CM, Friedman LR, Repkorwich R, Anidi IU, Forrest KM, et al. Novel management of pseudomonas biofilm-like structure in a post-pneumectomy empyema. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14: 1458652. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1458652. PMID: 39483118; PMCID: PMC11525003.
19. Quan Lin, Maokun Sheng, Yanjun Tian, Bing Li, Zhaodi Kang, Yingying Yang, et al. Antibiofilm activity and synergistic effects of DNase I and lysostaphin against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Food Quality and Safety.* 2024; 8: fyae024. Available from: <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyae024>.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВПЧ-ТЕСТИРОВАНИЯ В ОБРАЗЦАХ ЦЕРВИКАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ И БИОПСИЙНОГО МАТЕРИАЛА ШЕЙКИ МАТКИ

Г. Р. Байрамова [✉], Д. Ю. Трофимов, А. О. Андреев, О. В. Бурменская, А. В. Асатурова, В. Д. Пивень

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

В настоящее время при проведении скрининга на рак шейки матки в качестве первичного метода диагностики все чаще применяют тестирование на ДНК ВПЧ. Однако генотипы вируса папилломы человека (ВПЧ), регистрируемые при исследовании цервикальных мазков, могут отличаться от результатов тестирования в биопсированных фрагментах шейки матки. Целью исследования было изучить особенности детекции ДНК ВПЧ парных образцов эпителия цервикального канала и биопсийного материала шейки матки. ВПЧ-позитивным пациенткам ($n = 99$) была выполнена прицельная биопсия шейки матки. Регистрация ДНК ВПЧ произошла 175 раз в биоматериале, полученном из цервикального канала, и 111 раз в гистологических блоках. В группе пациенток с хроническим цервицитом показатель совпадения результатов тестирования на ДНК ВПЧ составил 28,3%, для группы с LSIL — 45%, для группы с HSIL — 67,7%. При низкой вирусной нагрузке ВПЧ соответствие результатов наблюдалось в 27,1% случаев, при умеренной вирусной нагрузке — в 35,4%, при высокой вирусной нагрузке — в 82,3%. Обнаружена относительно сильная корреляционная связь между уровнем вирусной нагрузки и вероятностью совпадения результатов ВПЧ-тестирования: при увеличении уровня вирусной нагрузки ВПЧ на 1 lg наблюдается увеличение процента соответствия результатов тестирования на ДНК ВПЧ между парными образцами на 9,3%.

Ключевые слова: ВПЧ-тестирование, вирусная нагрузка ВПЧ, патология шейки матки, биопсия шейки матки

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания № 124040300006-2 «Разработка тест-системы для обнаружения ранних признаков рака шейки матки и эндометрия на основе эпигенетического анализа ДНК в цервикальных мазках».

Благодарности: авторы благодарят заведующего лабораторией молекулярной онкогенетики ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» А. Р. Зарецкого за ценные замечания по концепции исследования и анализу его результатов.

Вклад авторов: Г. Р. Байрамова, Д. Ю. Трофимов — концепция и дизайн исследования; А. О. Андреев, О. В. Бурменская — сбор и обработка материала; А. В. Асатурова, О. В. Бурменская — статистическая обработка данных; А. О. Андреев, В. Д. Пивень — написание текста статьи; Г. Р. Байрамова, А. В. Асатурова — редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В. И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 11 от 25 ноября 2021 г.), проведено с соблюдением требований конфиденциальности персональных данных, этических норм и принципов проведения медицинских исследований с участием человека, изложенных в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием человека в качестве субъекта».

✉ **Для корреспонденции:** Гюльдана Рауфовна Байрамова
ул. Академика Опарина, д. 4Б, г. Москва, 117513, Россия; bayramova@mail.ru

Статья получена: 13.12.2024 **Статья принята к печати:** 26.12.2024 **Опубликована онлайн:** 31.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.073

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE RESULTS OF TESTING CERVICAL EPITHELIAL SAMPLES AND CERVICAL BIOPSY SPECIMENS FOR HPV

Bayramova GR [✉], Trofimov DYU, Andreev AO, Bourmenskaya OV, Asaturova AV, Piven VD

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

Currently, testing for human papillomavirus (HPV) DNA is more and more often used as a primary diagnosis method when conducting screening for cervical cancer. However, HPV genotypes reported when assessing cervical smears can differ from the results of testing cervical biopsy specimens. The study aimed to assess the features of detecting HPV DNA in the paired cervical canal epithelium samples and cervical biopsy specimens. HPV-positive patients ($n = 99$) underwent targeted cervical biopsy. The HPV DNA was detected 175 times in biomaterial obtained from the cervical canal and 111 times in histologic blocks. In the group of patients with chronic cervicitis, the rate of HPV DNA testing results match was 28.3%, in the group with LSIL it was 45%, and in the group with HSIL it was 67.7%. When the HPV viral load was low, the results were matched in 27.1% of cases, when the viral load was moderate in 35.4%, and when the viral load was high these were matched in 82.3% of cases. We revealed a relatively strong correlation between the viral load and the probability of the HPV test results match: the percentage of HPV DNA test results match between paired samples increases by 9.3% with the increase in the HPV viral load by 1 lg.

Keywords: HPV testing, HPV viral load, cervical pathology, cervical biopsy

Funding: the study was conducted within the framework of the State Assignment No. 124040300006-2 "Development of a test system to detect early signs of cervical and endometrial cancer based on epigenetic DNA analysis in cervical smears".

Acknowledgements: the authors would like to thank A.R. Zaretsky, head of the Laboratory of Molecular Oncogenetics, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, for valuable comments on the study concept and analysis of the results.

Author contribution: Bayramova GR, Trofimov DYU — study concept and design; Andreev AO, Bourmenskaya OV — data acquisition and processing; Asaturova AV, Bourmenskaya OV — statistical data processing; Andreev AO, Piven VD — manuscript writing; Bayramova GR, Asaturova AV — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol No. 11 dated 25 November 2021) and conducted in full compliance with the requirements for confidentiality of personal data, ethical standards and principles of conducting medical studies involving humans stated in the Declaration of Helsinki of the World Medical Association "Ethical principles for medical research involving human subjects".

✉ **Correspondence should be addressed:** Gyuldana R. Bayramova
Akademika Oparina, 4B, Moscow, 117513, Russia; bayramova@mail.ru

Received: 13.12.2024 **Accepted:** 26.12.2024 **Published online:** 31.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.073

Рак шейки матки (РШМ) — второе по распространенности злокачественное заболевание среди женщин репродуктивного возраста [1]. Доказано, что вирус папилломы человека (ВПЧ) является необходимым условием для развития большинства злокачественных новообразований (ЗНО) шейки матки [2, 3]. За последние годы большая часть стран изменила парадигму проведения национальных программ скрининга на рак шейки матки (РШМ), сделав выбор в пользу ВПЧ-тестирования как более чувствительного метода обследования по сравнению с цитологическим. До 90% случаев инфицирования ВПЧ являются транзиторными: самоэлиминация вируса наблюдается в течение 1–2 лет [3, 4]. Однако в 10% случаев развивается длительная персистенция ВПЧ, в ряде случаев приводящая к опухолевой трансформации [5, 6]. Общемировая распространенность ВПЧ варьирует от 43–72,8% [7, 8]. При этом только в США каждый год регистрируется более 14 млн новых случаев инфицирования ВПЧ [9]. Следует отметить, что развитию РШМ предшествуют плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки. Так, среди ВПЧ-позитивных женщин плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки легкой степени (LSIL) встречаются в 11,5% случаев, при этом плоскоклеточные интраэпителиальные поражения шейки матки тяжелой степени (HSIL) в 10,3% случаев [10].

В настоящее время обнаружение ДНК ВПЧ непосредственно в пораженной ткани шейки матки рассматривают как важный маркер вирусной активности, обладающий принципиальной прогностической ценностью в отношении вероятности развития предраковых и раковых поражений шейки матки [11–13]. Детекция ВПЧ в гистологическом образце достоверно отражает уровень контаминации вследствие того, что исследование проводят непосредственно на пораженном участке ткани, где этиологической причиной развития патологического процесса служит выявляемый генотип ВПЧ с определенной вирусной нагрузкой. Однако точного представления в разнице между регистрацией ДНК ВПЧ в цервикальном мазке и в биоптированных фрагментах шейки матки до сих пор не существует.

Цель исследования — изучить особенности и закономерности детекции ДНК ВПЧ в парных образцах мазков из цервикального канала и гистологического материала шейки матки.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено одномоментное исследование биологического материала 99 ВПЧ-позитивных пациенток, обратившихся в научно-поликлиническое отделение ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России в период с января по декабрь 2023 г. с целью диагностики патологии шейки матки. Для выполнения сравнительного анализа диагностической значимости регистрации ДНК ВПЧ определение генотипа ВПЧ и его вирусной нагрузки проводили попарно у каждой пациентки: в отделяемом цервикального канала и в биоптированном фрагменте шейки матки, полученном в ходе выполнения прицельной биопсии шейки матки радиоволновым методом. Все пациентки были разделены на три группы в зависимости от гистологической верификации диагноза:

1) группа 1 — женщины с гистологическим заключением «LSIL» ($n = 34$);

2) группа 2 — пациентки с гистологическим заключением «HSIL» ($n = 31$);

3) группа 3 — пациентки с гистологическим заключением «Хронический цервицит» ($n = 34$) (группа сравнения).

Критерии включения пациенток в исследование: возраст 18–65 лет, положительный результат ВПЧ-тестирования на основании анализа отделяемого из цервикального канала, гистологическое заключение патоморфологического исследования биоптированных фрагментов шейки матки: LSIL, HSIL, хронический цервицит.

Критерии исключения: беременность, период лактации, злокачественные новообразования шейки матки, воспалительные заболевания неспецифической этиологии в стадии декомпенсации.

Для проведения одномоментного поперечного исследования всем пациенткам выполняли следующие обследования:

1) сбор анамнеза и клинический осмотр пациентки (общий осмотр и бимануальное гинекологическое исследование);

2) тестирование на ДНК ВПЧ методом ПЦР в режиме реального времени с использованием диагностической панели, включающей в себя 21 генотип ВПЧ (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82);

3) расширенная кольпоскопия с целью визуализации потенциально патологического участка эпителия шейки матки для последующего проведения прицельной биопсии шейки матки;

4) цитологическое исследование методом жидкостной цитологии;

5) прицельная биопсия шейки матки с последующей гистологической верификацией диагноза;

6) определение ДНК ВПЧ с генотипированием и оценкой вирусной нагрузки методом ПЦР в режиме реального времени в биоптированных фрагментах шейки матки.

Тестирование на ДНК ВПЧ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием диагностической панели, определяющей 21 генотип ВПЧ. В качестве биологического материала для исследования использовали отделяемое цервикального канала, а также биоптаты шейки матки, полученные в результате прицельной биопсии. Биоптаты тканей шейки матки фиксировали в нейтральном забуференном формалине ($pH = 7,0$) в течение 24 ч. После фиксации образцы помещали в автоматический микроволновой гистопротектор Histo-Tek VP1 (Sakura, Япония) для проводки тканей и формировали парафиновые блоки на полуавтоматической станции для заливки тканей в парафин (Leica HistoCore Arcadia, Германия). Срезы с парафиновых блоков толщиной 5 мкм помещали в сухие пробирки объемом 1,5 мл и транспортировали их для проведения тестирования на ДНК ВПЧ аналогично пробиркам с биоматериалом из цервикального канала. Для исключения вероятности компрометации результатов сравнения данных определения ДНК ВПЧ в мазках из цервикального канала и биоптированных фрагментах шейки матки забор биоматериала проводили в период одного менструального цикла. Перед выделением ДНК из биоптатов проводили предварительную изоляцию парафина и обработку образцов протеиназой K с помощью набора Проба-ПК («ДНК-Технология», Россия), далее использовали наборы реагентов для выделения ДНК Проба-НК, предусматривающие спиртовое осаждение нуклеиновых кислот. Значения вирусной нагрузки в диапазоне от 0 до 3,0 Ig расценивали как низкую вирусную нагрузку ВПЧ, в диапазоне от 3,1 до 5 Ig — как умеренную, 5,1 Ig и выше — как высокую [14].

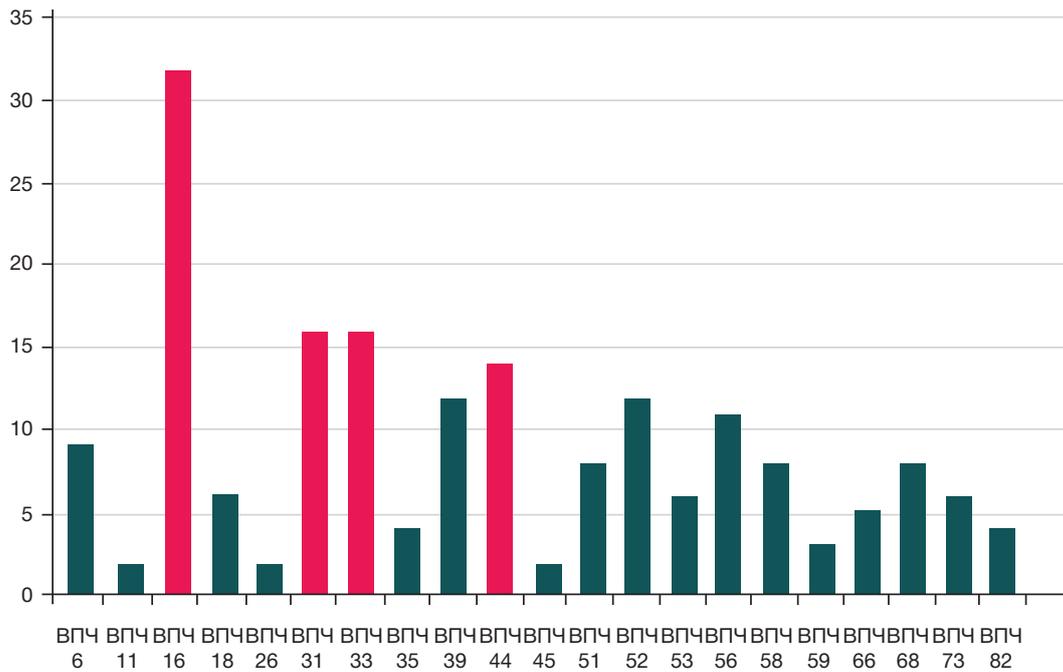


Рис. 1. Распределение генотипов ВПЧ в биоматериале из цервикального канала

Методы статистической обработки данных

Статистический анализ данных осуществляли с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics Version 20. (IBM, США). Проверка переменных на соответствие нормальному распределению (закону Гауса) осуществлялась с помощью теста Колмогорова–Смирнова. При проверке распределения переменных было выявлено, что большинство из них не подчиняется закону нормального распределения. Поэтому, как принято при описании данных, не подчиняющихся закону Гауса, было использовано значение медианы, которое меньше подвержено влиянию крайних вариаций. Меры рассеивания при этом были представлены верхним и нижним квартилями (Me (Q_1 ; Q_3)). Категориальные данные представлены как процентное соотношение с указанием 95%-го доверительного интервала (95% ДИ), рассчитанного по методу Уилсона. Для сравнения переменных в зависимости от их свойств (количественные или категориальные) использовали непараметрические тесты: хи-квадрат с поправкой Мантеля–Хэнзеля. За критический уровень значимости была принята величина $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные анализа показали, что среди 99 включенных в исследование парных образцов регистрация ДНК ВПЧ произошла 175 раз в биоматериале, полученном из цервикального канала, и 111 раз в гистологических блоках. Распределение случаев обнаружения ДНК ВПЧ в образцах цервикального канала выглядело следующим образом: хронический цервицит — 53/175 (30,3%), LSIL — 60/175 (34,3%), HSIL — 62/175 (35,4%). Следует отметить, что данная характеристика была менее однородной в гистологических образцах: хронический цервицит — 22/111 (19,8%), LSIL — 40/111 (36,0%), HSIL — 49/111 (44,1%). Обращает на себя внимание то, что при проведении ВПЧ-тестирования в гистологических образцах ткани шейки матки у пациенток с заключениями хронический цервицит и HSIL регистрация ДНК ВПЧ наблюдалась статистически

значимо реже по сравнению с результатами тестирования образцов эпителия цервикального канала ($p = 0,048$ и $p = 0,034$ соответственно). Нами был также проведен анализ распределения генотипов ВПЧ в зависимости от метода забора биологического материала (рис. 1, 2). В 25/111 (22,5%) случаев детекции ДНК ВПЧ в гистологических образцах обнаружены генотипы ВПЧ, присутствие которых не было выявлено по данным тестирования мазков из цервикального канала. В 8/25 (32%) подобных случаев выявлен 16-й генотип ВПЧ, в 7/25 (28%) — 33-й тип, в 6/25 (24%) — 51-й тип. Важно отметить, что чаще всего новая регистрация ДНК 16-го генотипа ВПЧ в гистологическом образце происходила в группе пациенток с LSIL (6/8, 75%).

Проведенный сравнительный анализ показал, что в 49,1% случаев детекция ДНК ВПЧ, зарегистрированная в клетках эпителия из цервикального канала, совпадала с результатами в гистологических образцах ткани, полученных в ходе выполнения прицельной биопсии шейки матки. Важно учитывать и внутигрупповые показатели совпадения данных ВПЧ-тестирования. Так, для группы пациенток с патоморфологическим заключением «хронический цервицит» показатель совпадения результатов теста на ДНК ВПЧ составил 28,3%, для группы женщин с LSIL — 45%, для группы пациенток с HSIL — 67,7% (рис. 3).

Одним из важных акцентов исследования была оценка распространенности случаев одновременного выявления двух и более генотипов ВПЧ. Так, по нашим данным, результаты тестирования на ДНК ВПЧ на основе материала, полученного при помощи мазка из цервикального канала, показали, что в 46/99 (46,5%) было выявлено несколько типов ВПЧ. Однако при проведении теста на ВПЧ в гистологическом материале, полученном в ходе выполнения прицельной биопсии шейки матки, подобных случаев было всего 13/99 (13,1%). Эти различия оказались статистически значимыми ($p < 0,001$).

В ходе проведения нами анализа корреляции результатов ВПЧ-тестирования был обнаружен заслуживающий внимания феномен. Интересно, что 44-й тип ВПЧ, входящий в тройку лидирующих по распространенности генотипов (14/175, 8%) и в большей мере ассоциированный с HSIL,

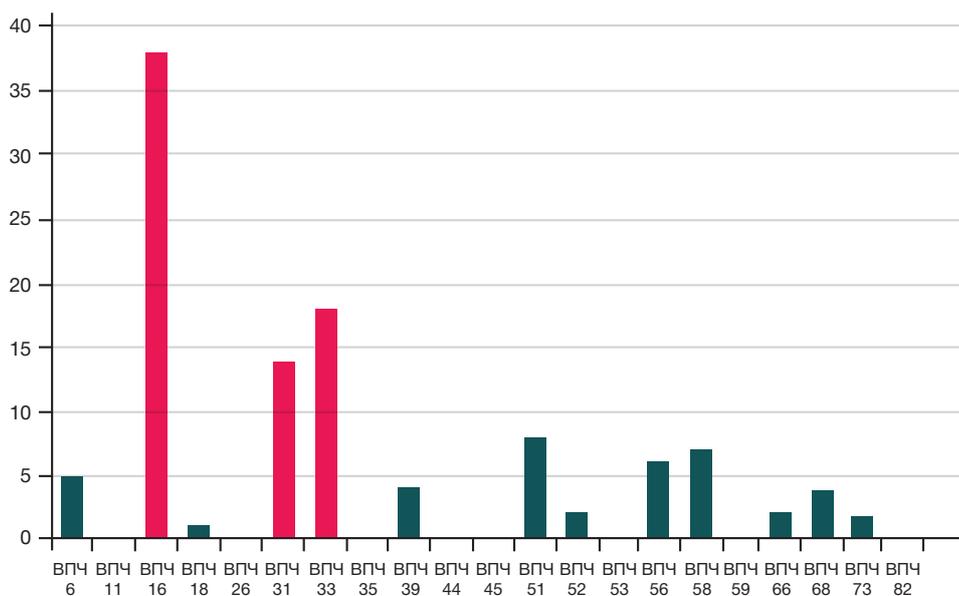


Рис. 2. Распределение генотипов ВПЧ в биоматериале из гистологического блока

чем с LSIL или хроническим цервицитом (50% vs 28,6% vs 21,4% соответственно), не был выявлен ни в одном гистологическом образце ткани шейки матки. Вместе с тем, остальные лидирующие типы ВПЧ продемонстрировали высокие показатели соответствия результатов тестирования: 16-й генотип — 30/32 (93,8%), 33-й генотип — 13/16 (81,3%), 31-й генотип — 11/16 (68,8%) (рис. 4).

Особый интерес исследования представляет изучение влияния вирусной нагрузки ВПЧ на различные показатели, такие как встречаемость, частота обнаружения случаев одновременного инфицирования несколькими типами ВПЧ, степень поражения шейки матки. В частности, нами проведен анализ роли количественного измерения ВПЧ на показатель соответствия результатов тестирования. Так, при тестировании на ДНК ВПЧ биоматериала, полученного при помощи забора мазка из цервикального канала, было выявлено 62 случая с высокой вирусной нагрузкой ВПЧ, 65 — с умеренной вирусной нагрузкой, 48 — с низкой. При проведении теста на ВПЧ в гистологическом материале распределение выглядело следующим образом: в 52 образцах — высокая вирусная нагрузка, в 37 — умеренная, в 23 — низкая. Следует учитывать, что 22,5% детекций

ДНК ВПЧ в гистологических образцах были выявлены впервые. Следовательно, эти случаи мы не учитывали при расчете корреляции результатов тестирования по принципу количественного определения ВПЧ. Так, результаты проведенного анализа свидетельствуют о том, что при низкой вирусной нагрузке ВПЧ соответствие результатов наблюдалось в 27,1% случаев, при умеренной вирусной нагрузке — в 35,4%, при высокой вирусной нагрузке — в 82,3% (рис. 5). Важно отметить, что разница в значении соответствия результатов между высокой и умеренной, а также между высокой и низкой вирусной нагрузками ВПЧ была статистически значима ($p < 0,001$ для обоих сравнений). Расчет критерия V Крамера показал относительно сильную корреляционную связь между уровнем вирусной нагрузки и вероятностью совпадения результатов ВПЧ-тестирования (таблица). При сравнении умеренной и низкой вирусной нагрузки ВПЧ не было выявлено статистически значимой разницы ($p = 0,456$).

Кроме того, мы провели расчет корреляции результатов ВПЧ-тестирования в зависимости от каждого диапазона вирусной нагрузки величиной в 1 lg. Так, увеличение параметра вирусной нагрузки ВПЧ на 1 lg увеличивает

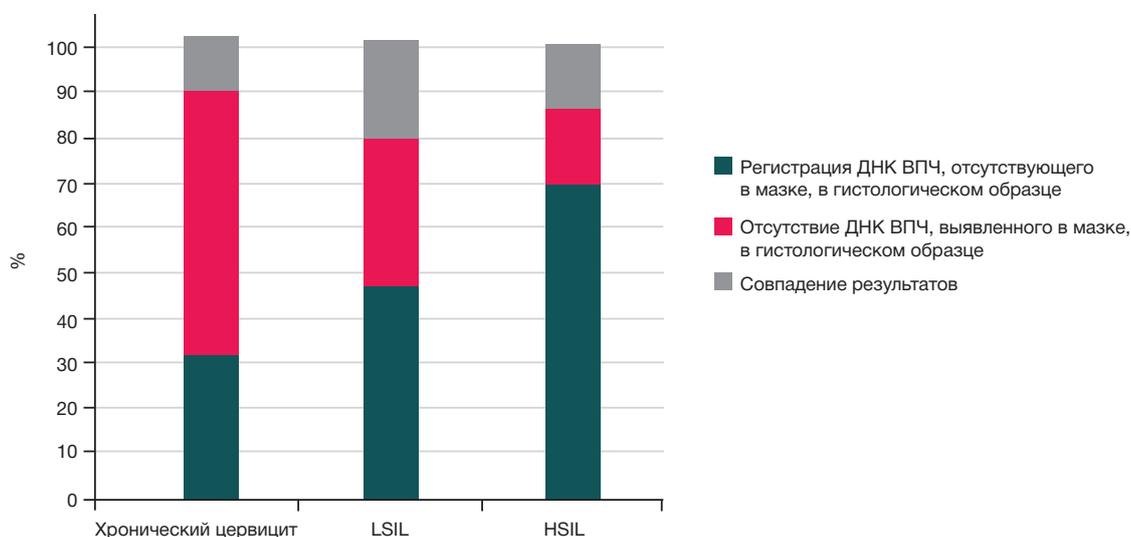


Рис. 3. Сравнительный анализ соответствия случаев регистрации ДНК ВПЧ по группам в зависимости от локализации полученного биоматериала

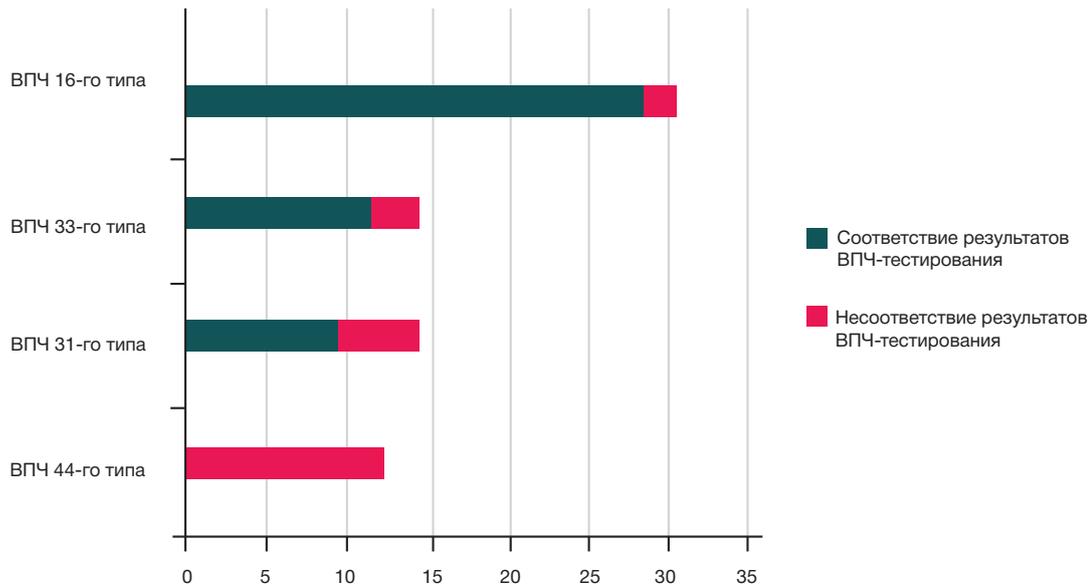


Рис. 4. Сравнительный анализ основных лидирующих генотипов ВПЧ в эпителии цервикального канала и биопсийном материале шейки матки

вероятность подтверждения инфицирования выявленным в биоматериале из цервикального канала генотипом ВПЧ в изначально определенном количественном соотношении на 9,3%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Следует отметить, что подобные работы в мире встречаются крайне редко, вследствие этого при подготовке к выполнению исследования мы ориентировались на проведенный эксперимент, в котором 74 парных цитологических и гистологических образца рака шейки матки тестировали на диагностической панели, состоящей из 51 генотипа ВПЧ [13]. Результаты работы свидетельствуют о том, что в 93% случаев наблюдалось соответствие между результатами тестирования на ВПЧ. При этом в случаях с низкой вирусной нагрузкой ВПЧ расхождение результатов выявлено в 78% случаев. Кроме того, процент выявляемости двух и более типов ВПЧ в одном исследуемом образце был статистически значимо ниже в биоптированных фрагментах ткани по сравнению с цитологическими мазками (14% vs 47%; $p < 0,001$). Следует отметить, что полученные нами данные подтверждают и во многом дополняют эти результаты. Так, для HSIL показатель совпадения результатов теста на ДНК ВПЧ составил 67,7%, для LSIL — 45%, для хронического цервицита — 28,3%. Значения, полученные авторами исследования, соответствуют тренду увеличения показателя соответствия результатов тестирования в зависимости от степени поражения шейки матки, обнаруженному нами. Кроме

того, проведенный анализ свидетельствует о том, что при низкой вирусной нагрузке ВПЧ соответствие результатов наблюдалось в 27,1% случаев, при умеренной вирусной нагрузке — в 35,4%, при высокой вирусной нагрузке — в 82,3%, что также соответствует результатам проведенного зарубежного исследования. Следует также отметить, что нами получены идентичные данные по распределению случаев с несколькими выявленными генотипами ВПЧ: в нашем исследовании выявление двух и более типов ВПЧ в биоптированных фрагментах ткани шейки матки было статистически значимо ниже по сравнению с биоматериалом из цервикального канала (13,1% vs 46,5%; $p < 0,001$). Важно также отметить выявленную нами особенность распределения 44-го генотипа ВПЧ. Несмотря на лидирующие позиции 44-го типа ВПЧ по результатам тестирования на ДНК ВПЧ из цервикального канала, данный генотип не был обнаружен ни в одном биопсийном образце шейки матки. Вероятно, это свидетельствует о том, что 44-й генотип ВПЧ обладает тропностью к клеткам цилиндрического эпителия. Учитывая полученные нами результаты ретроспективного исследования, которые демонстрируют ассоциированность 44-го генотипа с предраком шейки матки, возмозно, назрела необходимость в проведении дальнейших исследований в области изучения данного типа ВПЧ.

ВЫВОДЫ

Таким образом, с ростом уровня вирусной нагрузки ВПЧ возрастает вероятность обнаружения генотипов ВПЧ в

Таблица. Корреляционный анализ между уровнями вирусной нагрузки ВПЧ и степенью соответствия результатов ВПЧ-тестирования

Градация вирусной нагрузки ВПЧ	Случаи совпадения результатов тестирования	Случаи несоответствия результатов тестирования	Критерий V Крамера	Значение p
Высокая/низкая вирусная нагрузка	51/13	11/35	0,555	$p < 0,001$
Высокая/умеренная вирусная нагрузка	51/23	11/42	0,445	$p < 0,001$
Умеренная/низкая вирусная нагрузка	23/13	42/35	0,074	$p = 0,456$

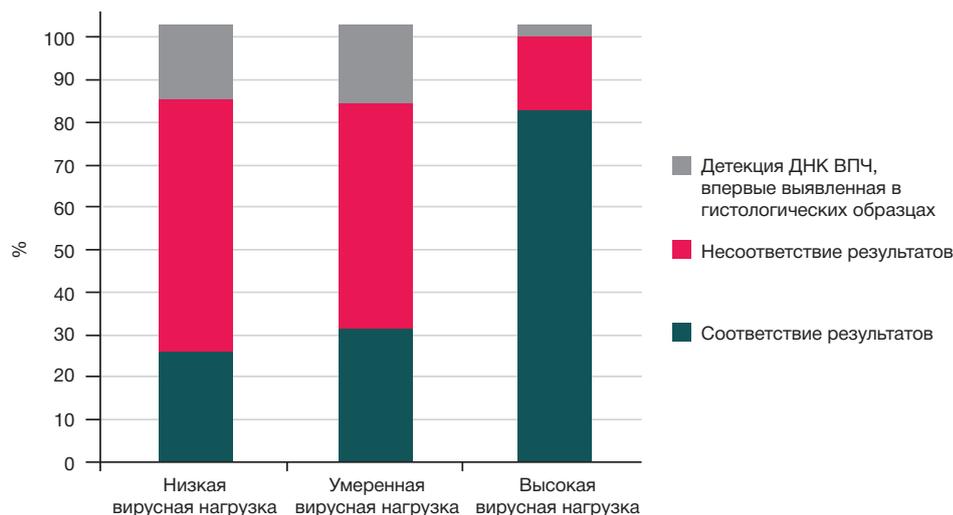


Рис. 5. Сравнительный анализ результатов ВПЧ-тестирования на основании определения вирусной нагрузки

пораженной ткани шейки матки. Кроме того, показатель соответствия результатов ВПЧ-тестирования в большей степени зависит от патоморфологического заключения —

чем выше степень поражения шейки матки, тем больше вероятность обнаружения ВПЧ в гистологических образцах.

Литература

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71 (3): 209–49. DOI: 10.3322/caac.21660.
- Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Translational Research.* 2017; 179: 168–82. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.07.004.
- Plisko O, Zodzika J, Jermakova I, Pcolkina K, Prusakevica A, Liepniece-Karele I, et al. Prediction of high-grade cervical precancerous abnormalities: The role of personal factors, vaginal microflora, sexually transmitted infections, and high-risk human papillomavirus. *PLoS One.* 2024; 19 (11): e0313004. DOI: 10.1371/journal.pone.0313004.
- Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011; 121 (12): 4593–9. DOI: 10.1172/JCI57149.
- Adams AK, Wise-Draper TM, Wells SI. Human papillomavirus induced transformation in cervical and head and neck cancers. *Cancers (Basel).* 2014; 6 (3): 1793–820. DOI: 10.3390/cancers6031793.
- Khumalo PG, Carey M, Mackenzie L, Sanson-Fisher R. Cervical cancer screening knowledge and associated factors among Eswatini women: A cross-sectional study. *PLoS One.* 2024; 19 (4): e0300763. DOI: 10.1371/journal.pone.0300763. PMID: 38635684; PMCID: PMC11025751.
- Hu H, Wu Y, Zhao M, Liu J, Xie P. Sleep duration time and human papillomavirus infection risk: The U-shaped relationship revealed by NHANES data. *PLoS One.* 2024; 19 (4): e0301212. DOI: 10.1371/journal.pone.0301212.
- Gomes FC, Galhardo DDR, Navegante ACG, Santos GSD, Dias HAAL, Dias Júnior JRL et al. Bioinformatics analysis to identify the relationship between human papillomavirus-associated cervical cancer, toll-like receptors and exomes: A genetic epidemiology study. *PLoS One.* 2024; 19 (8): e0305760. DOI: 10.1371/journal.pone.0305760.
- Scott-Wittenborn N, Fakhry C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Semin Radiat Oncol.* 2021; 31 (4): 286–96. DOI: 10.1016/j.semradonc.2021.04.001.
- Huiyun J, Jie D, Huan W, Yuebo Y, Xiaomao L. Prevalence and characteristics of cervical human papillomavirus genotypes and cervical lesions among 58630 women from Guangzhou, China. *J Infect Public Health.* 2023; 16 (10): 1531–6. DOI: 10.1016/j.jiph.2023.07.013. Epub 2023 Jul 21. PMID: 37562080.
- Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol.* 2007; 20 (2): 256–66. DOI: 10.1038/modpathol.3800737. Epub 2006 Dec 22. PMID: 17192787.
- Yoshida T, Sano T, Oyama T, Kanuma T, Fukuda T. Prevalence, viral load, and physical status of HPV 16 and 18 in cervical adenocarcinoma. *Virchows Arch.* 2009; 455 (3): 253–9. DOI: 10.1007/s00428-009-0823-x. PMID: 19727809.
- Halec G, Schmitt M, Dondog B, Sharkhuu E, Wentzensen N, Gheit T, Tommasino M, Kommoss F, Bosch FX, Franceschi S, Clifford G, Gissmann L, Pawlita M. Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132 (1): 63–71. DOI: 10.1002/ijc.27605. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22514107.
- Андреев А. О. Тактика ведения пациенток с плоскоклеточными поражениями шейки матки с учетом определения генотипа и вирусной нагрузки ВПЧ [диссертация]. М., 2024.
- Halec G, Schmitt M, Dondog B, Sharkhuu E, Wentzensen N, Gheit T, Tommasino M, Kommoss F, Bosch FX, Franceschi S, Clifford G, Gissmann L, Pawlita M. Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132 (1): 63–71. DOI: 10.1002/ijc.27605. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22514107.
- Kyrgiou M, Mitra A, Moscicki AB. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer? *Translational Research.* 2017; 179: 168–82. DOI: 10.1016/j.trsl.2016.07.004.
- Plisko O, Zodzika J, Jermakova I, Pcolkina K, Prusakevica A, Liepniece-Karele I, et al. Prediction of high-grade cervical precancerous abnormalities: The role of personal factors, vaginal microflora, sexually transmitted infections, and high-risk human papillomavirus. *PLoS One.* 2024; 19 (11): e0313004. DOI: 10.1371/journal.pone.0313004.

References

4. Gravitt PE. The known unknowns of HPV natural history. *J Clin Invest.* 2011; 121 (12): 4593–9. DOI: 10.1172/JCI57149.
5. Adams AK, Wise-Draper TM, Wells SI. Human papillomavirus induced transformation in cervical and head and neck cancers. *Cancers (Basel).* 2014; 6 (3): 1793–820. DOI: 10.3390/cancers6031793.
6. Khumalo PG, Carey M, Mackenzie L, Sanson-Fisher R. Cervical cancer screening knowledge and associated factors among Eswatini women: A cross-sectional study. *PLoS One.* 2024; 19 (4): e0300763. DOI: 10.1371/journal.pone.0300763. PMID: 38635684; PMCID: PMC11025751.
7. Hu H, Wu Y, Zhao M, Liu J, Xie P. Sleep duration time and human papillomavirus infection risk: The U-shaped relationship revealed by NHANES data. *PLoS One.* 2024; 19 (4): e0301212. DOI: 10.1371/journal.pone.0301212.
8. Gomes FC, Galhardo DDR, Navegante ACG, Santos GSD, Dias HAAL, Dias Júnior JRL et al. Bioinformatics analysis to identify the relationship between human papillomavirus-associated cervical cancer, toll-like receptors and exomes: A genetic epidemiology study. *PLoS One.* 2024; 19 (8): e0305760. DOI: 10.1371/journal.pone.0305760.
9. Scott-Wittenborn N, Fakhry C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Semin Radiat Oncol.* 2021; 31 (4): 286–96. DOI: 10.1016/j.semradonc.2021.04.001.
10. Huiyun J, Jie D, Huan W, Yuebo Y, Xiaomao L. Prevalence and characteristics of cervical human papillomavirus genotypes and cervical lesions among 58630 women from Guangzhou, China. *J Infect Public Health.* 2023; 16 (10): 1531–6. DOI: 10.1016/j.jiph.2023.07.013. Epub 2023 Jul 21. PMID: 37562080.
11. Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol.* 2007; 20 (2): 256–66. DOI: 10.1038/modpathol.3800737. Epub 2006 Dec 22. PMID: 17192787.
12. Yoshida T, Sano T, Oyama T, Kanuma T, Fukuda T. Prevalence, viral load, and physical status of HPV 16 and 18 in cervical adenosquamous carcinoma. *Virchows Arch.* 2009; 455 (3): 253–9. DOI: 10.1007/s00428-009-0823-x. PMID: 19727809.
13. Halec G, Schmitt M, Dondog B, Sharkhuu E, Wentzensen N, Gheit T, Tommasino M, Kommoss F, Bosch FX, Franceschi S, Clifford G, Gissmann L, Pawlita M. Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132 (1): 63–71. DOI: 10.1002/ijc.27605. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22514107.
14. Andreev AO. Taktika vedenija pacientok s ploskokletochnymi porazhenijami shejki matki s uchetom opredelenija genotipa i virusnoj nagruzki VPCh [dissertacija]. M., 2024. Russian.
15. Halec G, Schmitt M, Dondog B, Sharkhuu E, Wentzensen N, Gheit T, Tommasino M, Kommoss F, Bosch FX, Franceschi S, Clifford G, Gissmann L, Pawlita M. Biological activity of probable/possible high-risk human papillomavirus types in cervical cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132 (1): 63–71. DOI: 10.1002/ijc.27605. Epub 2012 Jul 9. PMID: 22514107.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ БАКТЕРИЯМИ-ЭПИБИОНТАМИ *NANOSYNBACTER LYTICUS* И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ПАРОДОНТА

Л. В. Побожьева [✉], Г. А. Скворцов-Игралов, Ю. А. Бочарова, И. С. Копецкий, И. В. Чеботарь

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

Патогенез воспалительных заболеваний пародонта детерминирован микроорганизмами полости рта. Кроме хорошо изученных пародонтопатогенов, при гингивите и пародонтите обнаруживаются микробные агенты с недоказанным клиническим значением, к числу которых принадлежат бактерии-эпибионты. Целью работы было определить взаимосвязь между присутствием эпибионта *Nanosynbacter lyticus* и воспалительными заболеваниями пародонта. У 47 участников исследования (среди них 31 женщина и 16 мужчин) в возрасте 18–45 лет с помощью ПЦР определяли наличие консервативных последовательностей ДНК, специфичных для родов *Nanosynbacter*, *Schaalia*, а также домена *Bacteria*. Результаты выражали в виде индексов, определяющих количественные соотношения между *N. lyticus* и *Schaalia spp.* (индекс NS), а также между *N. lyticus* и представителями домена *Bacteria* (индекс NB). У значительной доли (11/27, 40,7%) пациентов без пародонтита *Schaalia spp.* не были обнаружены. Все пациенты со средней и тяжелой степенью пародонтита, а также 75% пациентов с легкой степенью пародонтита были носителями *Schaalia spp.* Для всех *Schaalia*-позитивных образцов от пациентов с пародонтитом индекс NS был более высоким ($p < 0,05$), чем у *Schaalia*-позитивных образцов без пародонтита: медианы показателя NS составляли соответственно $Me = 0,89 (0,79; 0,93)$ и $Me = 0,63 (0,00; 0,73)$. Индекс NB у пациентов, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом ($Me = 0,83 (0,79; 0,85)$), был достоверно выше ($p < 0,05$), чем у пациентов без пародонтита, $Me = 0,67 (0,00; 0,81)$.

Ключевые слова: гингивит, пародонтит, бактерии, эпибионты, *Nanosynbacter lyticus*, *Schaalia odontolytica*

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания Минздрава России №121073000019-6.

Вклад авторов: Л. В. Побожьева — сбор образцов, анализ данных, написание проекта статьи; Г. А. Скворцов-Игралов — выполнение лабораторных исследований; Ю. А. Бочарова — дизайн исследования, анализ данных, И. С. Копецкий — критический пересмотр статьи в части значимого интеллектуального содержания; И. В. Чеботарь — дизайн исследования, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено локальным этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова (протокол № 238 от 19 марта 2024 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Людмила Владимировна Побожьева
ludmila-stomatolog@mail.ru

Статья получена: 07.10.2024 **Статья принята к печати:** 30.10.2024 **Опубликована онлайн:** 22.11.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.050

ASSOCIATION BETWEEN THE *NANOSYNBACTER LYTICUS* EPIBIOTIC BACTERIA AND INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES

Pobozhieva LV [✉], Skvortsov-Igralov GA, Bocharova YuA, Kopetskiy IS, Chebotar IV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The inflammatory periodontal disease pathogenesis is determined by microorganisms of the oral cavity. Along with the well-studied periodontopathogens, microbial agents of unproven clinical significance, including epibiotic bacteria, are found in individuals with gingivitis and periodontitis. The study aimed to determine the association between the *Nanosynbacter lyticus* epibiont and inflammatory periodontal diseases. Conservative DNA sequences specific for the genera *Nanosynbacter*, *Schaalia* and the *Bacteria* domain were identified using PCR in 47 study participants (31 females and 16 males) aged 18–45 years. The results were expressed as indices determining the quantitative relationships between *N. lyticus* and *Schaalia spp.* (NS index), as well as between *N. lyticus* and representatives of the *Bacteria* domain (NB index). *Schaalia spp.* were not found in a large share (11/27, 40.7%) of patients with no periodontitis. All patients with moderate-to-severe periodontitis, as well as 75% of patients with mild periodontitis were carriers of *Schaalia spp.* All the *Schaalia*-positive samples from patients with periodontitis showed higher NS indices ($p < 0.05$) compared to *Schaalia*-positive samples from patients with no periodontitis: the median NS values were $Me = 0.89 (0.79; 0.93)$ and $Me = 0.63 (0.00; 0.73)$, respectively. The patients suffering from chronic generalized periodontitis had significantly higher NB indices ($Me = 0.83 (0.79; 0.85)$) ($p < 0.05$) compared to patients with no periodontitis, $Me = 0.67 (0.00; 0.81)$.

Keywords: gingivitis, periodontitis, bacteria, epibionts, *Nanosynbacter lyticus*, *Schaalia odontolytica*

Funding: this work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation state assignment #121073000019-6.

Author contribution: Pobozhieva LV — sample collection, data analysis, manuscript draft writing; Skvortsov-Igralov GA — laboratory tests; Bocharova YuA — study design, data analysis, Kopetskiy IS — critical revision of the article in terms of important intellectual content; Chebotar IV — study design, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the local Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 238 dated 19 March 2024).

✉ **Correspondence should be addressed:** Ludmila V. Pobozhieva
ludmila-stomatolog@mail.ru

Received: 07.10.2024 **Accepted:** 30.10.2024 **Published online:** 22.11.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.050

Воспалительные заболевания пародонта являются одними из наиболее распространенных заболеваний полости рта. Тяжелые формы пародонтита встречаются более чем у 700 млн человек в мире [1]. Хотя пародонтит считают многофакторным процессом, ведущая роль микроорганизмов в его развитии неоспорима. Современные метагеномные исследования показывают, что пародонтит не обусловлен присутствием нескольких специфических пародонтальных патогенов, а является

результатом полимикробной синергии десятков видов микроорганизмов [2, 3]. Патогенетическая значимость многих представителей домена *Bacteria* до настоящего времени остается неясной. Кроме типичных пародонтопатогенов, к которым относят *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp.*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Filifactor alocis*, *Peptostreptococcus spp.* и др. [4–7], в ротовой полости обитает множество резидентных бактерий с

неизученными свойствами. Особый интерес вызывает группа некультивируемых бактерий, а именно эбионты, ведущие симбиотический образ жизни на поверхности других бактерий. *Nanosynbacter lyticus* — типичный пример эбионтов бактерий полости рта, который является эписимбиотом пародонтопатогена *Schaalia odontolytica* (прежнее название — *Actinomyces odontolyticus*) [8]. На сегодняшний день *N. lyticus* — единственный вид из рода *Nanosynbacter*, присутствие которого в полости рта человека доказано корректными исследованиями. О патогенетической роли *N. lyticus* имеются весьма противоречивые сведения. По одним данным, количество *N. lyticus* положительно коррелирует с воспалительными заболеваниями полости рта — периодонтитом, перикоронитом [9, 10]. Другие авторы обнаружили обратные результаты: увеличение количества *N. lyticus* сочеталось с уменьшением воспаления за счет угнетения бактерий-возбудителей [11].

Цель настоящей работы — определить взаимосвязь между присутствием бактерий *N. lyticus* и воспалительными заболеваниями пародонта.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 47 человек (31 женщина и 16 мужчин). Критерии включения в исследование: лица обоих полов, возраст 18–45 лет; отсутствие предшествующего стоматологического лечения в течение не менее шести месяцев. Критерии исключения: прием антибиотиков и применение антисептиков полости рта в течение последних трех месяцев; беременность, послеродовой период; возраст младше 18 лет и старше 45 лет; наличие острых воспалительных заболеваний; обострение хронической общесоматической патологии, соматические заболевания в стадии декомпенсации; онкологические заболевания, отказ от участия в исследовании. Общие сведения о пациентах представлены в табл. 1. Все участники дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Клиническая часть исследования включала сбор жалоб, анамнеза и осмотр полости рта. Диагностику заболеваний твердых тканей зубов и тканей пародонта проводили по МКБ-10 (K05.31 — хронический пародонтит, K05.10 — хронический гингивит, K02.1 — кариес), а также на основании классификации заболеваний пародонта Стоматологической ассоциации России.

Среди обследованных хронический катаральный генерализованный гингивит (K05.10) был выявлен в 21,3% случаев, хронический генерализованный пародонтит легкой степени тяжести (K05.31) — в 8,5% случаев, хронический генерализованный пародонтит средней степени тяжести (K05.31) — в 17%, хронический генерализованный пародонтит тяжелой степени (K05.31) — в 17% случаев. Доля лиц без воспалительных заболеваний пародонта составила 36,2% среди всех обследованных.

Для лабораторного исследования были собраны образцы поддесневого содержимого из зубодесневой борозды или пародонтального кармана. Образцы

транспортировали в лабораторию для выделения ДНК в охлажденном состоянии в течение 6 ч.

Перед выделением ДНК образцы инкубировали с раствором лизоцима (Sisce Research Laboratories; Индия), конечная концентрация 1 мг/мл, при 37 °С, 60 мин [12]. Выделение геномной ДНК из образцов проводили с использованием набора «SKYamp Micro DNA» (SkyGene; Россия). Проверку качества выделения проводили с помощью набора «Equalbit 1x dsDNA HS Assay Kit» (Vazyme; Китай), с использованием флуориметра «Fluo-200» (Allsheng; Китай).

Образцы выделенной ДНК анализировали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Определяли наличие консервативных последовательностей ДНК, специфичных для родов *Nanosynbacter*, *Schaalia*, а также домена *Bacteria* с использованием трех пар праймеров и трех зондов в разных каналах флуоресценции (табл. 2).

«Nuclease-free Water» (New England Biolabs; США) использовали как отрицательный контроль. В качестве положительных контролей использовали: 1) искусственно синтезированную олиго-ДНК, идентичную участку 23S рРНК *Nanosynbacter* (ранее эту группу бактерий называли *Saccharibacteria* или TM7), построенную на основе последовательностей из базы данных GenBank [13]; 2) ДНК бактерий из рода *Schaalia spp.* (прежнее название — *Actinomyces spp.*); 3) смесь бактериальной ДНК из культур *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Escherichia coli* ATCC 25922.

Состав смеси для ПЦР: 10 мкл «БиоМастер HS-qPCR» (HS-Taq ДНК-полимераза, смесь dNTP, ПЦР-буфер, Mg²⁺ и стерильная вода) (Biolabmix; Россия); по 2 мкл каждого специфического праймера (5 мкМ), 1 мкл специфического зонда (5 мкМ), 5 мкл образца с концентрацией ДНК не менее 0,1 нг/мкл. Смесь для ПЦР готовили согласно инструкции фирмы-производителя. Протокол реакции: 5 мин активации при 95 °С, затем 35 циклов по 15 с при 94 °С, 15 с при 62 °С и 20 с при 72 °С. Реакцию проводили при помощи амплификатора «ДТпрайм» («ДНК-технология»; Россия).

Для оценки количества ДНК каждого из исследуемых видов определяли значения пороговых циклов *C_p*. Далее при помощи статистических инструментов Microsoft Excel 2010 рассчитывали условные показатели, отражающие количественные соотношения между: 1) представителями *Nanosynbacter* и рода *Schaalia* (индекс NS) по значениям *C_p*; 2) бактериями рода *Nanosynbacter* и домена *Bacteria* (индекс NB) по значениям *C_p*. Показатели NS и NB рассчитывали по формулам:

$$NS = \frac{Cp^{-1}_{Nanosynbacter} * 100}{Cp^{-1}_{положительный контроль Nanosynbacter}} / \frac{Cp^{-1}_{Schaalia} * 100}{Cp^{-1}_{положительный контроль Schaalia}}$$

$$NB = \frac{Cp^{-1}_{Nanosynbacter} * 100}{Cp^{-1}_{положительный контроль Nanosynbacter}} / \frac{Cp^{-1}_{Bacteria} * 100}{Cp^{-1}_{положительный контроль Bacteria}}$$

Статистический анализ полученных результатов был выполнен с помощью программы IBM SPSS Statistics for Windows, version 27.0 (IBM Corp., США).

Таблица 1. Распределение участников исследования по полу и возрасту

Общее число обследованных, человек	n = 47	
Средний возраст обследованных, лет	34,2 (± 8,36) (min 18 – max 45)	
Распределение обследованных по полу, человек	Мужчины n = 16	Женщины n = 31
Средний возраст обследованных в зависимости от пола, лет	34,8 (± 9,41) (min 20 – max 45)	32,6 (± 8,54) (min 18 – max 43)

Таблица 2. Праймеры и зонды, используемые в данном исследовании

	Олигонуклеотид	<i>Nanosynbacter</i>	<i>Schaalia spp.</i>	Общая бактериальная ДНК
Прямой праймер		5'-GGCTTATAGCGCCCAATAG-3'	5'-GGTCTCTGGGCCGTTACTGA-3'	5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'
Обратный праймер		5'-CGGATATAAACCGAACTGTC-3'	5'-CCCCACACCTAGTGCCC-3'	5'-GGACTACCAGGGTATCTAATCC TGTT-3'
Зонд		(FAM) -5'-CATAGACGGCGCTGTTGGCAC-3'-(RTQ1)	(FAM)-5'- CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACC-3'-(TAMRA)	(ROX)-5'- CGTATTACCGCGCTGCTGGCAC-3'-(RTQ2)
Ссылка на литературу		[14]	[15]	[16]

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании 47 образцов не было обнаружено каких-либо корреляций индексов NS и NB с возрастом и полом пациентов. В 12 образцах из 47 (25,5%) специфичные для рода *Schaalia* нуклеотидные последовательности не были обнаружены. Все *Schaalia*-негативные образцы были получены от пациентов без признаков пародонтита тяжелой и средней степени тяжести, лишь один *Schaalia*-негативный образец был получен от пациента с легкой степенью пародонтита. В 7 из 12 *Schaalia*-негативных образцов были обнаружены *N. lyticus*.

У значительной доли (11/27, 40,7%) пациентов без пародонтита *Schaalia spp.* не были обнаружены. Все пациенты (100%) со средней и тяжелой степенью пародонтита, а также 3 из 4 (75%) пациентов с легкой степенью пародонтита были носителями *Schaalia spp.*

Индекс NS, отражающий соотношение между представителями рода *Nanosynbacter* и *Schaalia spp.*, был равен нулю в 8 образцах из 47 (17%); ни один из этих образцов не был получен у пациентов с пародонтитом. Для всех *Schaalia*-позитивных образцов от пациентов с пародонтитом (K05.31) индекс NS был высоким: Me = 0,89 (0,79; 0,93), что значительно больше ($p < 0,05$) по сравнению с другими *Schaalia*-позитивными образцами, для которых Me = 0,63 (0,00; 0,73).

Из 10 образцов, полученных от пациентов с хроническим катаральным генерализованным гингивитом, три образца не содержали специфичных для рода *Schaalia* генетических маркеров и один образец не содержал *Nanosynbacter*-специфичных маркеров. Поэтому позитивной корреляции между значениями индекса NS и диагнозом «хронический

катаральный генерализованный гингивит» (K05.10) не выявлено ($p > 0,05$).

Более интересные результаты были получены при исследовании индекса NB (см. рис.). Индекс NB у пациентов, страдающих хроническим генерализованным пародонтитом (K05.31) (Me = 0,83 (0,79; 0,85)), был достоверно выше ($p < 0,05$), чем у пациентов без пародонтита Me = 0,67 (0,00; 0,81)). Образцы от пациентов с пародонтитом легкой степени тяжести демонстрировали значения индекса NB (Me = 0,77 (0,38; 0,78)), которые существенно не отличались ($p > 0,05$) от значений NB в образцах от пациентов без пародонтита, но были значительно ниже ($p < 0,05$), чем показатели NB в образцах от пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени тяжести (Me 0,85 (0,81; 0,85) и Me 0,84 (0,81; 0,88) соответственно). Показатели NB от пациентов с пародонтитом средней и тяжелой степеней тяжести достоверно не отличались ($p > 0,05$).

Достоверных корреляций индекса NB с другими группами пациентов (гингивит, пациенты без воспалительных заболеваний полости рта) не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первое интересное наблюдение, возникающее при анализе результатов, касается несоответствия между присутствием в анализируемых образцах *N. lyticus* и бактерий *Schaalia spp.* Это доказывает, что *S. odontolytica* не является единственным хозяином для *N. lyticus*. Факт симбиоза *N. lyticus* с представителями других таксонов, включая *Actinomyces oris*, *Fusobacterium nucleatum*, был предсказан ранее [17–19].

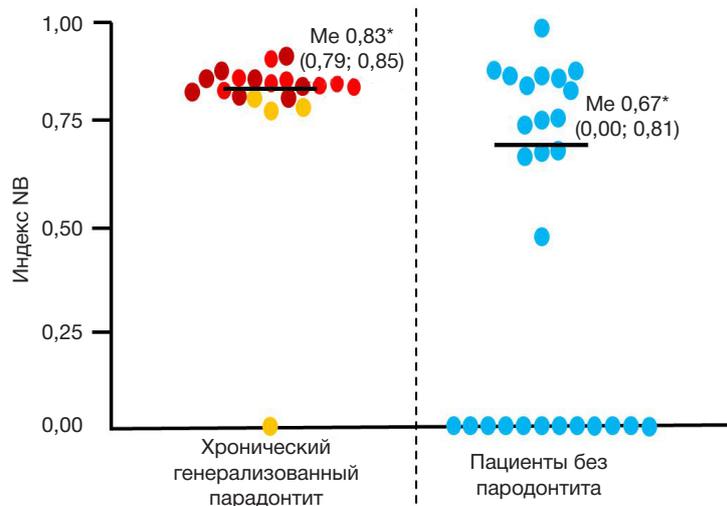


Рис. Индекс NB, отражающий соотношение между представителями рода *Nanosynbacter* и домена *Bacteria*, у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом и лиц без пародонтита. Оранжевым цветом показана легкая форма пародонтита, красным — пародонтит средней тяжести, бордовым — тяжелая форма. Me — медиана (в скобках — нижний и верхний квартили); * — статистически значимые различия показателей, $p < 0,05$

Второй результат подтверждает негативное участие бактерий *Schaalia spp.* в патогенезе средне-тяжелых и тяжелых форм пародонтита. Действительно, 100% пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени тяжести (K05.31) были носителями *Schaalia spp.*, тогда как значительная доля (40,7%) пациентов без пародонтита не являлись носителями этой группы бактерий. Эта находка дополняет литературные данные, свидетельствующие о том, что *S. odontolytica* (прежнее название — *A. odontolyticus*) активно образует биопленки в пародонтальных карманах, но не является значимым пародонтопатогеном [20].

Самый важный результат настоящего исследования касается положительной корреляции между индексом NS (отражает соотношение между представителями *Nanosynbacter* и *Schaalia spp.*) и степенью тяжести хронического генерализованного пародонтита. Наиболее логичным объяснением этого факта может быть повышение вирулентности бактерий *S. odontolytica* под влиянием увеличения количества закрепившихся на них эубионтов *N. lyticus*. Схожее наблюдение было сделано другими авторами, которые зарегистрировали индуцированное эубионтами через регуляторы системы «Quorum Sensing» усиление биопленкообразования у *A. odontolyticus* (современное название — *S. odontolytica*) [21].

В качестве полезного результата можно рассматривать наблюдение, касающееся отсутствия взаимосвязей между количеством *Nanosynbacter* и хроническим генерализованным гингивитом.

ВЫВОДЫ

Вероятно, *N. lyticus* являются симбионтами не только бактерий рода *Schaalia*, но и представителей других таксонов. Полученные нами результаты побуждают задуматься о проведении перспективного исследования, направленного на поиск новых хозяев *N. Lyticus*. Бактерии рода *Schaalia spp.* вовлечены в патогенез хронических генерализованных форм пародонтита средней и тяжелой степени. Индекс NB, отражающий соотношение между представителями рода *Nanosynbacter* и общим количеством бактерий, повышается при хроническом генерализованном пародонтите и может быть следствием усиления вирулентности патогенетически значимых бактерий под влиянием эубионтов *N. lyticus*. Индекс NS, отражающий соотношение между представителями рода *Nanosynbacter* и *Schaalia spp.*, не может быть полезным для оценки состояния тяжести у пациентов с хроническим генерализованным гингивитом.

Литература

- Yixin Li, Yonggang Xiang, Haixia Ren, et al. Association between periodontitis and dental caries: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. 2024; 28: 306. DOI: 10.1007/s00784-024-05687-2.
- Krutyholowa A, Strzelec K, Dziedzic A, Bereta GP, Łazarz-Bartyzel K, Potempa J, et al. Host and bacterial factors linking periodontitis and rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2022; 13: 980805. DOI: 10.3389/fimmu.2022.980805.
- Cai Z, Lin S, Hu S, Zhao L. Structure and function of oral microbial community in periodontitis based on integrated data. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 663756. DOI: 10.3389/fcimb.2021.663756.
- Jiao Y, Hasegawa M, Inohara N. The role of oral pathobionts in dysbiosis during periodontitis development. *Journal of Dental Research*. 2014; 93(6): 539–46. DOI: 10.1177/0022034514528212.
- Antezack A, Etcheopar-Etchart D, La Scola B, Monnet-Corti V. New putative periodontopathogens and periodontal health-associated species: a systematic review and meta-analysis. 2023; 58: 893–906. DOI: 10.1111/jre.13173
- Valm AM. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol*. 2019; 431 (16): 2957–69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.016.
- Hajshengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*. 2014; 35 (1): 3–11. DOI: 10.1016/j.it.2013.09.001.
- Daniel R Utter, Xuesong He, Colleen M Cavanaugh, et al. The saccharibacterium TM7x elicits differential responses across its host range. *The ISME Journal*. 2020; 14 (12): 3054–67. DOI: 10.1038/s41396-020-00736-6.
- Bo Liu, Faller LL, Klitgord N, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLOS one*. 2012; 7 (6): 37919. DOI: 10.1371/journal.pone.0037919.
- Mansfield JM, Campbell JH, Bhandari AR, et al. Molecular analysis of 16S rRNA genes identifies potentially periodontal pathogenic bacteria and archaea in the plaque of partially erupted third molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 70 (7): 1507–14. DOI: 10.1016/J.JOMS.2011.09.049.
- Chipashvili O, Utter DR, Bedree JK, et al. Epibiotic Saccharibacteria suppresses gingival inflammation and bone loss in mice through host bacterial modulation. *Cell Host & Microbe*. 2021; 29 (11): 1649–62. DOI: 10.1016/J.CHOM.2021.09.009.
- Rosenbaum J, Usyk M, Chen Z, et al. Evaluation of oral cavity DNA extraction methods on bacterial and fungal microbiota. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 1531. DOI: 10.1038/s41598-018-38049-6.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: D36–42. DOI: 10.1093/nar/gks1195.
- Ahmad Ibrahim, Mohamad Maatouk, Andriamiharimamy Rajaonison, et al. Adapted protocol for Saccharibacteria cocultivation: two new members join the club of candidate phyla radiation. *Microbiol Spectr*. 2021; 9 (3): e0106921. DOI: 10.1128/spectrum.01069-21.
- Bilgiler C, Fuereder T, Kastner M-T, et al. Oral abundance of actinomyces spp. in breast cancer patients. *Oncology*. 2022; 100 (4): 221–7. DOI: 10.1159/000522070.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002; 148 (Pt 1): 257–66. DOI: 10.1099/00221287-148-1-257.
- Ying Qi, Sheng-qi Zang, Juan Wei, et al. High-throughput sequencing provides insights into oral microbiota dysbiosis in association with inflammatory bowel disease. *Genomics*. 2021; 113 (1): 664–76. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.09.063.
- Utter DR, He X, Cavanaugh CM, et al. The saccharibacterium TM7x elicits differential responses across its host range. *The ISME Journal*. 2020; 14 (12): 3054–67. DOI: 10.1038/s41396-020-00736-6.
- Jie Nie, Utter DR, Kerns KA. Strain-Level Variation and diverse host bacterial responses in Epibiotic Saccharibacteria. *mSystems*. 2022; 7 (2): e0148821. DOI: 10.1128/msystems.01488-21.
- Könönen E, Wade WG. Actinomyces and related organisms in human infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015; 28 (2): 419–42. DOI: 10.1128/CMR.00100-14.
- Bedree JK, Bor B, Sen J, et al. Quorum sensing modulates the epibiotic-parasitic relationship between *Actinomyces odontolyticus* and its *Saccharibacteria* epibiont, a *Nanosynbacter lyticus* Strain, TM7x. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2049. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02049.

References

1. Yixin Li, Yonggang Xiang, Haixia Ren, et al. Association between periodontitis and dental caries: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*. 2024; 28: 306. DOI: 10.1007/s00784-024-05687-2.
2. Krutyholowa A, Strzelec K, Dziedzic A, Bereta GP, Łazarz-Bartyzel K, Potempa J, et al. Host and bacterial factors linking periodontitis and rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2022; 13: 980805. DOI: 10.3389/fimmu.2022.980805.
3. Cai Z, Lin S, Hu S, Zhao L. Structure and function of oral microbial community in periodontitis based on integrated data. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 663756. DOI: 10.3389/fcimb.2021.663756.
4. Jiao Y, Hasegawa M, Inohara N. The role of oral pathobionts in dysbiosis during periodontitis development. *Journal of Dental Research*. 2014; 93(6): 539–46. DOI: 10.1177/0022034514528212.
5. Antezack A, Etchecopar-etchart D, La Scola B, Monnet-Corti V. New putative periodontopathogens and periodontal health-associated species: a systematic review and meta-analysis. 2023; 58: 893–906. DOI: 10.1111/jre.13173.
6. Valm AM. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol*. 2019; 431 (16): 2957–69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.016.
7. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*. 2014; 35 (1): 3–11. DOI: 10.1016/j.it.2013.09.001.
8. Daniel R Utter, Xuesong He, Colleen M Cavanaugh, et al. The saccharibacterium TM7x elicits differential responses across its host range. *The ISME Journal*. 2020; 14 (12): 3054–67. DOI: 10.1038/s41396-020-00736-6.
9. Bo Liu, Faller LL, Klitgord N, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLOS one*. 2012; 7 (6): 37919. DOI: 10.1371/journal.pone.0037919.
10. Mansfield JM, Campbell JH, Bhandari AR, et al. Molecular analysis of 16S rRNA genes identifies potentially periodontal pathogenic bacteria and archaea in the plaque of partially erupted third molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 70 (7): 1507–14. DOI: 10.1016/J.JOMS.2011.09.049.
11. Chipashvili O, Utter DR, Bedree JK, et al. Episymbiotic Saccharibacteria suppresses gingival inflammation and bone loss in mice through host bacterial modulation. *Cell Host & Microbe*. 2021; 29 (11): 1649–62. DOI: 10.1016/J.CHOM.2021.09.009.
12. Rosenbaum J, Usyk M, Chen Z, et al. Evaluation of oral cavity DNA extraction methods on bacterial and fungal microbiota. *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 1531. DOI: 10.1038/s41598-018-38049-6.
13. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: D36–42. DOI: 10.1093/nar/gks1195.
14. Ahmad Ibrahim, Mohamad Maatouk, Andriamiharimamy Rajaonison, et al. Adapted protocol for Saccharibacteria cocultivation: two new members join the club of candidate phyla radiation. *Microbiol Spectr*. 2021; 9 (3): e0106921. DOI: 10.1128/spectrum.01069-21.
15. Bilgiler C, Fuereder T, Kastner M-T, et al. Oral abundance of actinomyces spp. in breast cancer patients. *Oncology*. 2022; 100 (4): 221–7. DOI: 10.1159/000522070.
16. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002; 148 (Pt 1): 257–66. DOI: 10.1099/00221287-148-1-257.
17. Ying Qi, Sheng-qj Zang, Juan Wei, et al. High-throughput sequencing provides insights into oral microbiota dysbiosis in association with inflammatory bowel disease. *Genomics*. 2021; 113 (1): 664–76. DOI: 10.1016/j.ygeno.2020.09.063.
18. Utter DR, He X, Cavanaugh CM, et al. The saccharibacterium TM7x elicits differential responses across its host range. *The ISME Journal*. 2020; 14 (12): 3054–67. DOI: 10.1038/s41396-020-00736-6.
19. Jie Nie, Utter DR, Kerns KA. Strain-Level Variation and diverse host bacterial responses in Episymbiotic Saccharibacteria. *mSystems*. 2022; 7 (2): e0148821. DOI: 10.1128/msystems.01488-21.
20. Könönen E, Wade WG. Actinomyces and related organisms in human infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015; 28 (2): 419–42. DOI: 10.1128/CMR.00100-14.
21. Bedree JK, Bor B, Sen J, et al. Quorum sensing modulates the epibiotic-parasitic relationship between Actinomyces odontolyticus and its Saccharibacteria epibiont, a Nanosynbacter lyticus Strain, TM7x. *Front Microbiol*. 2018; 9: 2049. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02049.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТА ГИПОТЕРМИИ ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАННОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ПО МЕТАБОЛОМУ КРОВИ

С. М. Эльдаров^{1,2}✉, Н. Л. Стародубцева¹, Ю. А. Шевцова^{1,2}, К. В. Горюнов¹, О. В. Ионов¹, Д. Н. Силачев^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета, Москва, Россия

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) — тяжелая неонатальная патология, вызывающая различные неврологические нарушения, одна из основных причин смертности доношенных детей. Ключевым методом лечения умеренной и тяжелой ГИЭ является терапевтическая гипотермия (ТГ) — снижение температуры тела новорожденных, которая существенно уменьшает риск летального исхода и способствует улучшению долгосрочных исходов у детей с ГИЭ. Однако для применения этого метода критически важна своевременная диагностика и определение тяжести заболевания, кроме того он имеет ряд ограничений и требований. Актуальны изучение механизма действия ТГ, поиск основных метаболических путей и потенциальных мишеней для терапии ГИЭ. Целью работы было с помощью методов ВЭЖХ-МС исследовать метаболом сухих пятен крови как менее инвазивной для пациента пробы для поиска маркеров и метаболических путей, наиболее активных при ТГ и, вероятно, опосредующих ее положительные эффекты. В результате были обнаружены изменения в классе фосфоглицеролипидов, что может свидетельствовать о важной роли метаболизма эндоканнабиноидов в защите организма от ГИЭ. Кроме того, были изменены пути метаболизма убихинона, ряда жирных кислот, а также желчных кислот. Таргетные количественные исследования данных метаболитов позволят оптимизировать диагностику ГИЭ и ее терапию на основе выявленных потенциальных мишеней.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, неонатальная асфиксия, метаболомика, диагностика, гипоксически-ишемическая энцефалопатия

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Российского научного фонда – грант № 22-15-00454.

Вклад авторов: С. М. Эльдаров — пробоподготовка образцов, проведение ВЭЖХ-МС/МС, обработка хромато-масс-спектрометрических данных, написание и редактирование рукописи; Н. Л. Стародубцева — анализ метаболомных результатов, статистический анализ; написание и редактирование рукописи; Ю. А. Шевцова — проведение модельного эксперимента, получение и характеристика образцов, обсуждение результатов, написание и редактирование рукописи; К. В. Горюнов — проведение модельного эксперимента, получение и характеристика образцов, написание и редактирование рукописи; О. В. Ионов — планирование исследования, редактирование рукописи; Д. Н. Силачев — планирование исследования, обсуждение результатов, написание и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ (протокол № 8/22 от 12 июня 2022 г.). Исследование проводили в соответствии со стандартами этического комитета НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ и Хельсинкской декларации 1964 г.

✉ **Для корреспонденции:** Чупалав Максудович Эльдаров
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; me@chup4lav.ru

Статья получена: 03.12.2024 **Статья принята к печати:** 18.12.2024 **Опубликована онлайн:** 29.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.069

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF HYPOTHERMIA AFTER SIMULATED HYPOXIC ISCHEMIC ENCEPHALOPATHY BASED ON BLOOD METABOLOME

Eldarov SM^{1,2}✉, Starodubtseva NL¹, Shevtsova YuA^{1,2}, Goryunov KV¹, Ionov OV¹, Silachev DN^{1,2}

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

Hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) is a severe neonatal condition causing various neurological disorders and one of the main causes of mortality among full-term babies. Therapeutic hypothermia (TH), i.e. the newborn's body temperature decrease that significantly reduces the risk of fatality and contributes to improvement of long-term outcomes in infants with HIE is the key treatment method for moderate-to-severe HIE. However, the timely diagnosis and disease severity determination are crucial for this method to be used, and the method has a number of limitations and requirements. Assessment of the mechanism underlying the effects of TH and the search for the major metabolic pathways and potential targets for HIE therapy are relevant. The study aimed to assess metabolome of dried blood spots by HPLC-MS, since it is the least invasive to patients test for the search for markers and metabolic pathways most active in TH that are likely to mediate its positive effects. As a result, alterations in the class of phosphoglycerolipids were found, which suggests an important role of endocannabinoid metabolism in protection of the body against HIE. Furthermore, metabolic pathways of ubiquinone, certain fatty acids, and bile acids were altered. The targeted quantitative studies of these metabolites will make it possible to optimize HIE diagnosis and treatment based on the potential targets identified.

Keywords: mass spectrometry, neonatal asphyxia, metabolomics, diagnosis, hypoxic ischemic encephalopathy

Funding: the study was supported by the Russian Federation on behalf of the Russian Science Foundation (grant No. 22-15-00454).

Author contribution: Eldarov SM — sample preparation, conducting HPLC-MS/MS, chromatography–mass spectrometry data processing, manuscript writing and editing; Starodubtseva NL — metabolomic data analysis, statistical analysis; manuscript writing and editing; Shevtsova YuA — conducting the model experiment, sample acquisition and characterization, discussing the results, manuscript writing and editing; Goryunov KV — conducting the model experiment, sample acquisition and characterization, manuscript writing and editing; Ionov OV — study planning, manuscript editing; Silachev DN — study planning, discussing the results, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Moscow State University (protocol No. 8/22 dated 12 June 2022). The study was compliant with the standards of the Ethics Committee of the Belozersky Institute Of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, and the Declaration of Helsinki (1964).

✉ **Correspondence should be addressed:** Chupalav M. Eldarov
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; me@chup4lav.ru

Received: 03.12.2024 **Accepted:** 18.12.2024 **Published online:** 29.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.069

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) — это тяжелое неврологическое состояние, возникающее из-за нехватки кислорода и недостаточного кровоснабжения мозга новорожденного до или во время родов. Частота умеренных и тяжелых форм ГИЭ составляет 1–8 случаев на 1000 живорождений в странах с развитой медициной и не имеет тенденции к снижению. ГИЭ является причиной 6–9% случаев смертности новорожденных и 21–23% случаев смертности среди доношенных детей, а у 25% пострадавших развиваются серьезные неврологические нарушения (церебральный паралич, эпилепсия, судороги и задержка в развитии) [1].

Своевременная диагностика и точное определение степени тяжести ГИЭ критически важны для улучшения исходов и повышения качества жизни детей [2]. Терапевтическая гипотермия (ТГ) — это ключевой метод лечения умеренной и тяжелой ГИЭ, широко применяемый в отделениях интенсивной терапии. Данный подход существенно снижает риск летального исхода и способствует улучшению долгосрочных результатов у детей с ГИЭ [3].

Снижение температуры тела или головы в рамках ТГ замедляет метаболические процессы, снижает потребность нейронов в кислороде, уменьшает уровень оксидативного стресса и его медиаторов — глутамата и свободных радикалов. Кроме того, подавляется воспалительная реакция и предотвращается апоптоз клеток, что смягчает последствия первичного гипоксически-ишемического инсульта [4]. Однако для достижения оптимальных результатов необходимо начать ТГ в течение первых шести часов жизни (острая фаза гипоксически-ишемического повреждения), до активации вторичных механизмов повреждения, таких как воспаление и апоптоз [5]. К сожалению, несмотря на доказанную эффективность ТГ, около 20% новорожденных с умеренно-тяжелой или тяжелой ГИЭ не получают необходимого лечения из-за поздней диагностики [6]. ТГ имеет ряд ограничений, и ее применение может быть опасным при неправильной диагностике [7]. Это подчеркивает важность быстрого реагирования и совершенствования диагностических процедур в неонатологии, в том числе анализа биохимических маркеров, ассоциированных с повреждением головного мозга.

Поиск маркеров ГИЭ затруднен как низкой частотой данной патологии в популяции, так и сложностью разграничения с сопутствующими патологиями, например сепсисом и врожденными метаболическими нарушениями [2, 8]. Использование неинвазивных образцов (моча, кал) и малоинвазивных (кровь, сухие пятна крови) позволяет эффективно изучать динамику молекулярного состава биожидкостей. Остаточные образцы после рутинных процедур можно применять для дальнейших исследований без дополнительных вмешательств.

Для идентификации маркеров, связанных исключительно с повреждением мозга, проводят исследования в контролируемых условиях на модельных системах [8, 9]. Модель Райса–Ваннуччи, предложенная в 1981 г., наиболее часто используют как доклиническую модель для изучения ГИЭ и применяют в лабораториях по всему миру на протяжении последних четырех десятилетий [9, 10].

Омиксные технологии, объединяющие геномику, транскриптомику, протеомику и метаболомику, в значительной степени способствовали уточнению сложных патофизиологических механизмов, лежащих в основе ГИЭ. Данные процессы включают изменения

в энергетическом обмене клеток мозга, окислительный стресс, нарушение метаболизма нейротрансмиттеров и гормонов, а также апоптоз нейронов и активацию нейротрофических (защитных) механизмов [5, 8, 11–13]. Анализ метаболических изменений в сухих каплях крови с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) является перспективной стратегией для улучшения диагностики и прогнозирования ГИЭ у новорожденных. Совместно с методами многофакторного анализа метод ВЭЖХ-МС позволяет выделять целые паттерны биомолекул, специфичные для гипоксически-ишемического (ГИ) повреждения мозга [5].

Цель данного исследования — уточнение молекулярных механизмов и идентификация маркеров повреждения головного мозга, запускаемых при гипотермии при восстановлении после ГИ повреждения мозга на модифицированной модели Райса–Ваннуччи методом нецелевой метаболомики (ВЭЖХ-МС) сухих пятен крови в отрицательной моде.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование ГИЭ

Протокол работы с животными был одобрен локальным этическим комитетом в соответствии с принципами Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA). Для экспериментов использовали аутбредных белых крыс, полученных из вивария НИИ Физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ.

Для моделирования ГИ повреждения мозга применяли модифицированную модель Райса–Ваннуччи [26–27]. Семидневные крысята обоих полов были анестезированы 1%-м изофлюраном, после чего левая сонная артерия была хирургически изолирована и электрокоагулирована. Через 1,5 ч крысят помещали в CO₂-инкубатор (Binder; Туттлинген, Германия) с газовой смесью из 8% кислорода и 92% азота при 37 °C на 2 ч.

Терапевтическая гипотермия

Крыс случайным образом помещали в группы нормотермии и гипотермии сразу после окончания ГИ на 6 ч, после чего получали образцы сухих пятен крови. Всего в эксперименте участвовали три группы животных: контрольная группа ($n = 13$), крысы с ГИЭ и последующей шестичасовой гипотермией ($n = 16$), и крысы с ГИЭ и шестичасовой нормотермией ($n = 14$). Нормотермию поддерживали на уровне 37 °C, гипотермическое восстановление происходило при 30 °C. Крысят помещали в открытом контейнере на водяной бане для поддержания нужной температуры.

Отбор сухих пятен крови

Кровь у крысят брали через 6 ч после нормотермии/гипотермии из подключичной артерии и наносили по 40 мкл на тест-бланк из фильтровальной бумаги PerkinElmer 226. При нанесении крови на бланк следили за тем, чтобы кончик шприца не касался бумаги. После высыхания пятна крови проверяли на пригодность для анализа (площадь бумаги, пропитанная кровью, должна быть не менее 3 мм в диаметре). Образцы считали непригодными, если площадь пятна крови была недостаточной, а в случае небольших образцов — если кровь не пропитала бумагу насквозь.

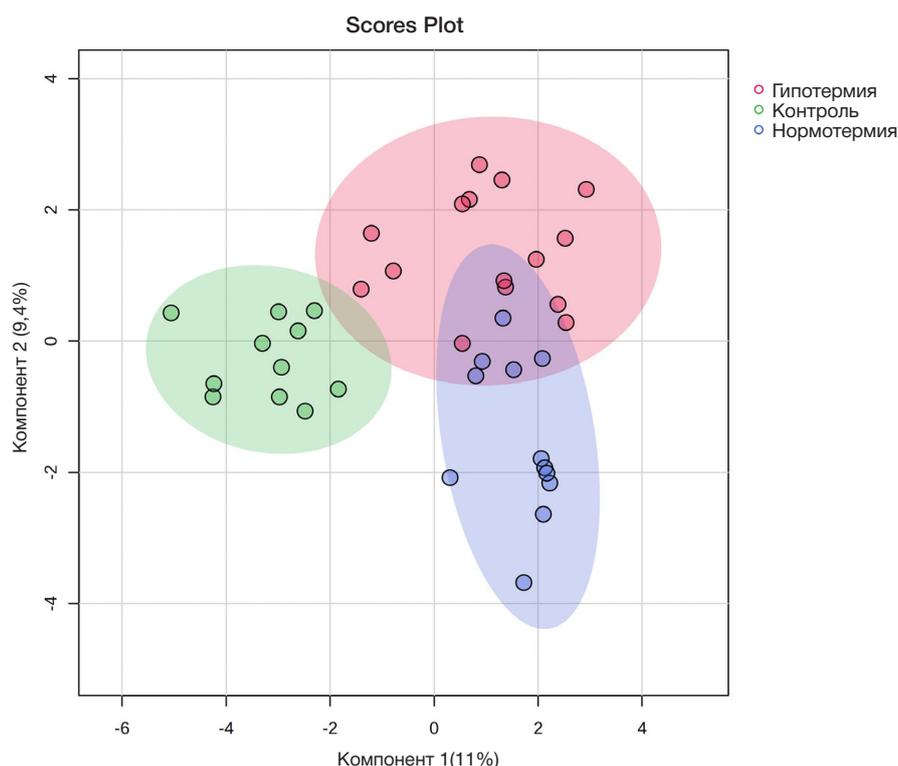


Рис. 1. Результаты многомерного статистического анализа трех исследованных групп животных методом sPLS-DA

Пятна считали также непригодными, если в образце присутствовали микросгустки, указывающие на то, что пятно было неоднородно распределено по бумаге.

Приготовление образцов для ВЭЖХ-МС-анализа

Метаболиты из сухих пятен крови экстрагировали методом Фолча [14]. К каждому образцу (три круглых фрагмента сухого пятна крови диаметром 5 мм каждый) добавляли 480 мкл смеси хлороформа и метанола (в соотношении 2 : 1) и 250 мкл воды. Экстракционную смесь вортексировали 10 мин, а затем центрифугировали при 15 000 g в течение 10 мин. Органическую фазу (150 мл) из нижней части эппендорфа переносили в отдельную пробирку. Этот этап экстракции повторяли с добавлением еще одной порции смеси хлороформ–метанол. 100 мкл органической фазы после второго центрифугирования смешивали с ранее собранной. Полученную смесь высушивали в струе азота при комнатной температуре, а затем повторно растворяли в 100 мл смеси ацетонитрила и изопропанола (в соотношении 1 : 1).

ВЭЖХ-МС-анализ и идентификация веществ

Последующий анализ проводили методом ВЭЖХ-МС. Для хроматографического разделения сложной смеси веществ использовали обратнофазную колонку Atlantis T3 C18 (зерно 3 мкм, длина 15 см, внутренний диаметр 1 мм; Waters, Милфорд, Массачусетс, США) и хроматограф Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Scientific; Уолтем, Массачусетс, США) [30–31]. Подвижная фаза «А» состояла из смеси ACN : H₂O (60 : 40), а подвижная фаза «В» — из IPA : ACN : H₂O (90 : 8 : 2). Обе фазы содержали модификаторы (0,1% муравьиной кислоты и 5 мм формиата аммония). Элюирование проводили с градиентом подвижной фазы «В» при скорости потока 40 мкл/мин: 0–0,5 мин при 10%, затем 20-минутный градиент от 10% до 99%. Затем проводили

10-минутную промывку 99%-й концентрацией фазы «В», после чего фазу возвращали к ее начальной концентрации (10% от фазы «В») в течение 1 мин и уравнивали колонку 3 мин. Общее время хроматографии для каждого образца составило 34,5 мин при скорости потока 40 мкл/мин и температуре колонки 50 °С. Метаболиты определяли с помощью гибридного квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Bruker MaXis Impact (Bruker Daltonics; Бремен, Германия), с двумя повторами на образец при следующих параметрах прибора: напряжение на капиллярах — 4500 В; давление небулайзера — 0,6 Па, расход осушающего газа — 5,0 л/мин при 200 °С. Масс-спектры были получены с разрешением 50 000 в диапазоне 50–1700 m/z при отрицательной полярности.

Обнаружение пиков, группировка и коррекция времени удерживания были выполнены с использованием программного пакета xcms. Алгоритм Centwave был использован для детекции пиков с определенными параметрами: максимальное отклонение m/z составляет 15 ppm, а ширина пика — 10–45 с. Группировку пиков выполняли методом Peak Density с параметрами по умолчанию [15–16]. Идентификацию метаболитов проводили на основе базы данных Human Metabolome (<https://www.hmdb.ca>).

Статистические методы

Для выявления и визуализации различий между группами был проведен многомерный статистический анализ с использованием метода наименьших квадратов (sPLS-DA) для нескольких групп и ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS-DA) для парного сравнения в составе пакета Metaboanalyst 6.0.0 (<https://metaboanalyst.ca>). Статистическую значимость различий в относительных концентрациях (средних интегральных площадях пиков) конкретных метаболитов между группами оценивали с помощью *t*-критерия, при этом значение *p*

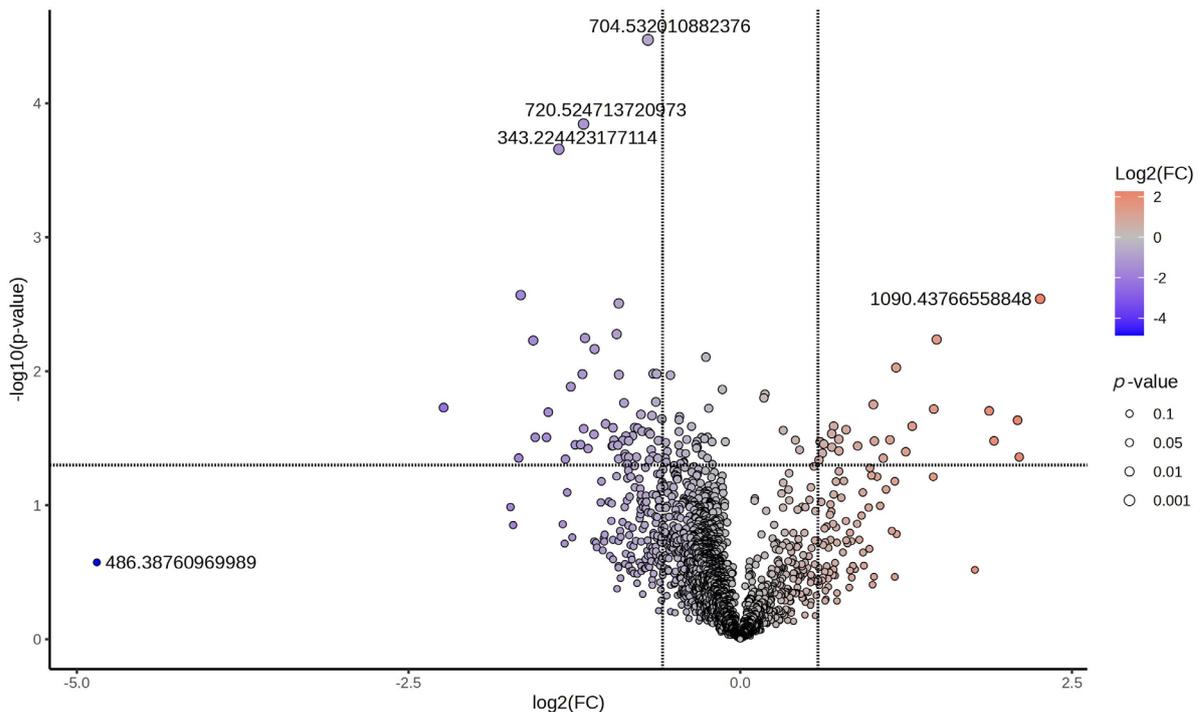


Рис. 2. Результаты парного одномерного статистического анализа метаболома сухих пятен крови группы гипотермичных и нормотермичных животных

менее 0,05 считали статистически значимым. В качестве дополнительного критерия для идентификации потенциальных биомаркеров кратность изменения была ограничена значением 1,5. Анализ путей обогащения проводили с использованием функции анализа избыточной репрезентативности пакета Metaboanalyst 6.0.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ масс-спектров, выполненный в режиме регистрации отрицательных ионов, позволил выявить 3425 молекулярных ионов. Для оценки различий между группами животных был применен многомерный статистический метод частичных наименьших квадратов (sPLS-DA). На основании результатов, представленных на рис. 1, наблюдается четкое разделение групп, что указывает на значимые метаболические изменения, характерные для каждой из них. Это подчеркивает наличие специфических молекулярных различий, лежащих в основе разделяющих факторов (рис. 2).

Для поиска потенциальных метаболических биомаркеров нами был проведен парный одномерный статистический анализ пары нормотермия-гипотермия (рис. 2). Всего обнаружено 55 молекулярных ионов, из которых 27 демонстрировали повышение концентрации в образцах животных, подвергшихся гипотермии, по сравнению с группой нормотермии. В то же время концентрация 28 молекулярных ионов была снижена. Учитывали только статистически значимые изменения уровней концентрации (не менее чем в 1,5 раза, при уровне значимости $p < 0,05$). Идентификацию выявленных соединений производили с использованием баз данных LIPID MAPS и HMDB, результаты представлены в табл. 1. Полученные данные указывают на существенные изменения в метаболизме фосфоэтанолламинов и фосфатидных кислот при гипотермии в сравнении с нормотермией, тогда как уровни жирных кислот остались относительно стабильными. Для расширенного анализа был применен метод многомерной

статистики — ортогональные частичные наименьшие квадраты (OPLS), что позволило выявить четкое разделение групп нормотермии и гипотермии. Результаты подтверждают наличие значимых метаболических различий между этими физиологическими состояниями (рис. 3). По результатам анализа были отобраны (топ-200) молекулярные ионы, которые внесли наибольший вклад в разделение групп (VIP score >1), для них были проведены идентификация и поиск наиболее вовлеченных метаболических путей по базе данных SMPDB. При гипотермии были идентифицированы изменения активности путей биосинтеза желчных кислот, убихинона и плазмалогенов, а также метаболизма ряда жирных кислот, эстрогенов и андрогенов (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ГИЭ является одной из главных причин неврологических отклонений, а также неонатальной смертности. Ишемия с последующей гипоксией приводит к гибели нейронов в течение 12–36 ч, что делает своевременную диагностику ГИЭ и оценку тяжести повреждений одним из важных факторов для успешного прогнозирования исхода и подбора адекватной терапии. Стандартными методами диагностики ГИЭ являются МРТ и аЭЭГ головного мозга, которые позволяют в некоторой степени оценить физические и функциональные повреждения мозга. Однако информативность этих методов ограничена: так, МРТ зачастую невозможна при тяжелых состояниях новорожденного, сопряжена с необходимостью седации и проводится спустя сутки и более после рождения, а аЭЭГ не обладает достаточной чувствительностью для ранней диагностики. Кроме того, данные методы не содержат количественных маркеров, позволяющих достоверно оценить степень тяжести ГИЭ, соответственно, прогнозирование исходов остается нетривиальной задачей.

В то же время одним из основных методов терапии ГИЭ является терапевтическая гипотермия, при которой

Таблица 1. Список потенциальных биомаркеров, статистически значимо отличающихся между группами терапевтической гипотермии и контроля

m/z	Название	Кратность изменений	Аддукт
294,157	CAR 6:0	2,32	[M+Cl] ⁻
343,224	17-HDoHE	-2,34	M-H
353,308	FA 22:1;O	-4,58	[M-H] ⁻
611,385	PA 30:4	-2,78	[M-H] ⁻
677,386	PA 32:3	-2,09	[M+Cl] ⁻
720,524	PS O-32:0	-1,9	[M-H] ⁻
750,475	PE 36:6-OH	-2,42	M-H
802,503	PE 40:8-OH	2,26	M-H
812,523	PE 42:9	2,13	M-H
826,501	PE 42:10-OH	2,4	M-H
829,52	PG 38:4-2OH	3,09	M-H
833,478	PA 40:5-3OH	-1,6	M+Cl
841,577	PG 38:0	-2,64	[M+Cl] ⁻
856,601	PE 42:3-2OH	-3,16	M-H
873,621	PA 46:3	-2,14	M+Cl
878,53	PE 40:4-3OH	4,01	M+Cl
883,471	PGP 36:3-2OH	3,68	M-H
885,485	PI 16:2-2OH	1,7	M-H
933,672	TG 56:5	-2,32	M+Cl
952,447	MIPC 29:2;O5	-2,55	M+Cl
953,468	PGP 40:6-OH	1,71	M+Cl
1021,451	PIP 36:4-3OH	1,68	M+Cl
627,343	LysoPI 20:0	0,63325	M-H
704,532	PE-Nme 32:0	0,66455	M-H
803,506	PA 40:3-O	1,9181	M+Cl
838,536	PE 44:10	3,5626	M-H
854,53	PE 44:10-OH	2,1599	M-H
902,476	PS 42:10-3OH	0,59297	M-H

голова новорожденного охлаждается до 32–35 °C на 48–72 ч. Для достижения нейропротекторного эффекта процедуру необходимо начинать в первые 6 ч жизни новорожденного. Один из методов ранней диагностики ГИЭ — исследование биомаркеров крови, поскольку ГИЭ сопряжено с повреждениями не только мозга, но и сердца, печени и других органов, что вызывает изменения их метаболизма. Изучая изменения биомаркеров крови в динамике, возможно соотнести изменения с развивающимися повреждениями и ответом организма, адаптируя в дальнейшем получаемую пациентом терапию под эти изменения. Ранее было показано использование изменений провоспалительных и иных маркеров в крови для диагностики ГИЭ. В то время как взятие венозной крови для последующего исследования является золотым стандартом в медицине, этот метод сопряжен с рядом неудобств в силу его инвазивности, необходимости обучения персонала и сложности обеспечения условий хранения и транспортировки собранных образцов. Особенно это актуально в случае работы с новорожденными с тяжелыми патологиями. В нашей работе для исследования метаболома мы использовали сухие пятна крови. Данный метод, являющийся одним из способов микросемплирования (отбора малых доз) крови, получает все большее распространение в силу малой инвазивности, простоты протокола и удобства хранения коллекций собранного материала. Для использования метода важно оценить, насколько эффективно его использование для выявления ранних биомаркеров крови.

Использование методов многомерного статистического анализа выявило заметные различия не только по сравнению с интактной группой, но и между группами нормотермии и гипотермии (рис. 2), что отражает изменения метаболизма при ГИЭ и при ГИЭ в условиях нормотермии. Парный статистический анализ с последующей идентификацией позволил выявить изменения в классах фосфатидных кислот (PA), фосфатидинозитолов (PI) и фосфатидилэтаноламинов (PE), которые относятся к глицерофосфолипидам, а также триглицеридам и ацилкарнитинам. При этом выявлено повышение концентрации PI. Согласно литературным данным, ишемия мозга приводит к деградации PI и диацилглицеролов. Таким образом, увеличение пула PI и фосфатидмилинозитолфосфата в группе с терапевтической гипотермией может свидетельствовать об ингибировании процессов его деградации при гипотермии, что оказывает нейропротекторный эффект. В группе гипотермии наблюдалось также повышение концентрации короткоцепочечных ацилкарнитиннов (C6). Ранее на клеточной модели было показано, что короткоцепочечные ацилкарнитины усиливают экспрессию генов, связанных с антиоксидантной активностью в условиях окислительного стресса [17]. Что касается фосфатидных кислот, то они являются мессенджерами и интермедиатами других глицеролипидов, таких как PE и фосфатидилсерина (PS) [18]. В группе нормотермии можно видеть снижение концентрации интермедиатов в виде фосфатидных кислот и повышение PE и PS. В свою очередь, PE

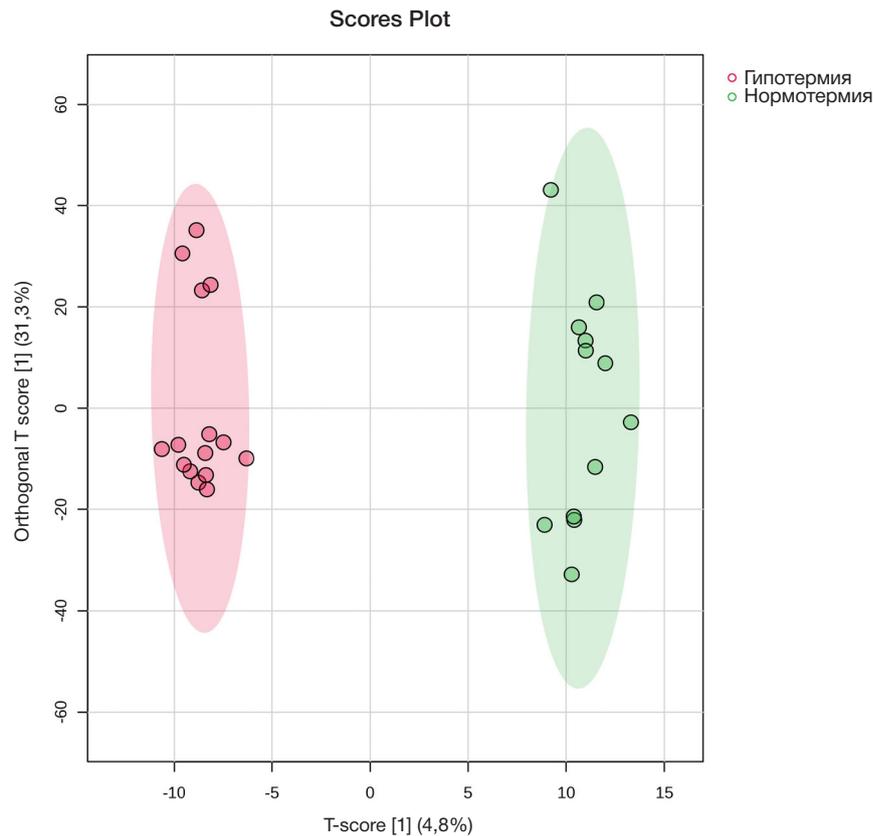


Рис. 3. Разделение групп при многомерном статистическом анализе методом ортогональных частичных наименьших квадратов (OPLS-DA)

являются предшественниками ряда эндоканнабиноидов, нейропротекторная роль которых хорошо известна [19–22]. Таким образом, применение терапевтической гипотермии привело к повышению концентрации ряда метаболитов, ассоциированных со снижением окислительного стресса от ишемии-реперфузии и нейропротекторами, а также их предшественниками, что определенно может снижать общий уровень повреждений от ГИЭ.

В рамках исследования были также проанализированы основные метаболические пути, изменяющиеся при гипотермии по сравнению с группой нормотермии. Для этого были идентифицированы молекулярные ионы, внесшие наибольший вклад в различие между группами в модели многомерного статистического анализа OPLS-DA (VIP, 200 наиболее «весомых» молекулярных ионов), и выявлены метаболические пути, к которым они относятся. В число наиболее вовлеченных путей вошли синтез убихинона, желчных кислот, ненасыщенных жирных кислот и плазмалогенов (табл. 2). Наличие в списке желчных кислот может показаться необычным, однако в ряде работ ранее уже было показано, что желчные кислоты могут проходить гематоэнцефалический барьер, выполняя важные функции мессенджеров и нейромодуляторов [23–24]. Желчные кислоты обладают

нейропротекторными свойствами, attenuируя воспаление и последствия окислительного стресса, такие как апоптоз [23–24], что особенно интересно в контексте обширного окислительного стресса от ишемии-реперфузии при ГИЭ [25–27]. То же можно сказать и о ненасыщенных жирных кислотах — как линолевая, так и альфа-линоленовая жирные кислоты играют важную роль в реагировании и адаптации организма к острой ишемии путем регуляции нейронных сигнальных путей с помощью оксипинов — окисленных производных [28], проявляют выраженные нейропротекторные и даже антидепрессантные свойства [29]. Что же касается убихинона, то его роль в защите от окислительного стресса широко известна ([30] и др.).

ВЫВОДЫ

Таким образом, в ходе нашего исследования был выявлен ряд изменений метаболома при применении метода терапевтической гипотермии, который указывает на смягчение повреждений мозга, вызванных ГИЭ, одновременно с включением путей, отвечающих за синтез различных нейропротекторов и нейромодуляторов. Эти результаты подтверждают представление о терапевтической

Таблица 2. Метаболические пути, в наибольшей степени обуславливающие различия между группами нормотермии и терапевтической гипотермии, согласно данным OPLS-DA

Название	Совпадений	P-value
Биосинтез желчных кислот	4	0,0016
Биосинтез убихинона	2	0,0125
Метаболизм альфа-линоленовой и линолевой кислот	1	0,143
Синтез Плазмалогенов	1	0,211
Метаболизм эстрогенов и андрогенов	1	0,261

гипотермии, как об эффективном методе терапии последствий ГИЭ. Использование масс-спектрометрии позволяет получить информацию об изменениях метаболизма уже в первые несколько часов после родов. В то же время таргетные количественные исследования

выявленных метаболитов — глицерофосфолипидов, желчных кислот и других — у пациентов с различной степенью тяжести ГИЭ может позволить выработать эффективную систему ранней классификации тяжести ГИЭ и прогнозирования исходов.

Литература

1. Törn AE, Hesselman S, Johansen K, Ågren J, Wikström A-K, Jonsson M. Outcomes in Children after Mild Neonatal Hypoxic Ischaemic Encephalopathy: A Population-Based Cohort Study. *BJOG Int. J Obstet Gynaecol.* 2023.
2. Caramelo I, Coelho M, Rosado M, Cardoso CMP, Dinis A, Duarte CB, et al. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *World J Pediatr.* 2023; 19: 505–48.
3. Abate BB, Bimerew M, Gebremichael B, Mengesha Kassie A, Kassaw M, Gebremeskel T, et al. Effects of therapeutic hypothermia on death among asphyxiated neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *PLoS One.* 2021; 16 (2); e0247229.
4. Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li GY. Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci.* 2019; 13: 586.
5. Korf JM, McCullough LD, Caretti V. A narrative review on treatment strategies for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Transl Pediatr.* 2023; 12: 1552–71.
6. DuPont TL, Chalak LF, Morriss MC, Burchfield PJ, Christie L, Sánchez PJ. Short-Term Outcomes of Newborns with Perinatal Acidemia Who Are Not Eligible for Systemic Hypothermia Therapy. *J Pediatr.* 2013; 162: 35–41.
7. Prempunpong C, Chalak LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective Research on Infants with Mild Encephalopathy: The PRIME Study. *J Perinatol.* 2018; 38: 80–85.
8. She HQ, Sun YF, Chen L, Xiao QX, Luo BY, Zhou HS, et al. Current analysis of hypoxic-ischemic encephalopathy research issues and future treatment modalities. *Front Neurosci.* 2023; 17: 1136500.
9. Landucci E, Pellegrini-Giampietro DE, Facchinetti F. Experimental Models for Testing the Efficacy of Pharmacological Treatments for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Biomedicines.* 2022; 10 (5): 937.
10. Tokareva A, Starodubtseva N, Frankevich V, Silachev D. Minimizing Cohort Discrepancies: A Comparative Analysis of Data Normalization Approaches in Biomarker Research. *Computation.* 2024; 12: 137.
11. Eldarov C, Starodubtseva N, Shevtsova Y, Goryunov K, Ionov O, Frankevich V, et al. Dried Blood Spot Metabolome Features of Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: A Neonatal Rat Model *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 8903.
12. Shevtsova Y, Starodubtseva N, Tokareva A, Goryunov K, Sadekova A, Vedikhina I, et al. Metabolite Biomarkers for Early Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: An Experimental Study Using the NeoBase 2 MSMS Kit in a Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 2035.
13. Shevtsova Y, Eldarov C, Starodubtseva N, Goryunov K, Chagovets V, Ionov O, et al. Identification of Metabolomic Signatures for Ischemic Hypoxic Encephalopathy Using a Neonatal Rat Model. *Children.* 2023; 10: 1693.
14. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497–509.
15. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization Methods for Reducing Interbatch Effect without Quality Control Samples in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Studies. *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413: 3479–86.
16. Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Comparison of the Effectiveness of Variable Selection Method for Creating a Diagnostic Panel of Biomarkers for Mass Spectrometric Lipidome Analysis. *J Mass Spectrom.* 2021; 56: e4702.
17. Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Nicolai R, Calvani M, et al. Antioxidant effect of l-carnitine and its short chain esters: Relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *International Journal of Cardiology.* 2006; 54–60.
18. Fantini J, Yahi N. Chapter 3 — Lipid Metabolism and Oxidation in Neurons and Glial Cells. In: Jacques Fantini, Nouara Yahi, editors. *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease.* Academic Press, 2015; p. 53–85.
19. Hahnefeld L, Vogel A, Gurke R, Geisslinger G, Schäfer MKE, Tegeder I. Phosphatidylethanolamine Deficiency and Triglyceride Overload in Perilesional Cortex Contribute to Non-Goal-Directed Hyperactivity after Traumatic Brain Injury in Mice. *Biomedicines.* 2022; 10: 914.
20. Duranti A, Beldarrain G, Álvarez A, Sbriscia M, Carloni S, Balduini W. et al. The Endocannabinoid System as a Target for Neuroprotection/Neuroregeneration in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Biomedicines.* 2022; 11 (1): 28.
21. Sagredo O, Palazuelos J, Gutierrez-Rodríguez A, Satta V, Galve-Roperh I, Martínez-Orgado J. Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Biochem Pharmacol.* 2018; 157: 85–96.
22. Fernández-Ruiz J, Moro MA, Martínez-Orgado J. Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: From preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics.* 2015; 12: 793–806.
23. Xing C, Huang X, Wang D, et al. Roles of bile acids signaling in neuromodulation under physiological and pathological conditions. *Cell Biosci.* 2023; 13: 106.
24. Yeo Xin Yi, Tan Li Yang, Chae Woo Ri, Lee Dong-Yup, Lee Yong-An, Wuestefeld Torsten. Liver's influence on the brain through the action of bile acids. *Frontiers in Neuroscience.* 2023; 17.
25. Kletkiewicz H., Wojciechowski MS., Rogalska J. Cannabidiol effectively prevents oxidative stress and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) in an animal model of global hypoxia. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 15952.
26. Kong W, Lu C. Role of mitochondria in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Histol Histopathol.* 2024; 39 (8): 991–1000.
27. Baldari B, De Simone S, Cipolloni L, Frisoni P, Alfieri L, D'Errico S, et al. Oxidative Stress Markers in Human Brain and Placenta May Reveal the Timing of Hypoxic-Ischemic Injury: Evidence from an Immunohistochemical Study. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (15): 12221.
28. Hennebelle M, Zhang Z, Metherel AH, et al. Linoleic acid participates in the response to ischemic brain injury through oxidized metabolites that regulate neurotransmission. *Sci Rep.* 2017; 7: 4342.
29. Blondeau N, Lipsky RH, Bourourou M, Duncan MW, Gorelick PB, Marini AM, Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties — Ready for Use in the Stroke Clinic? *BioMed Research International.* 2015; 519830.
30. Obolenskaia ON, Gorodetskaya EA, Kalenikova EI, Belousova MA, Gulyaev MV, Makarov VG, et al. Intravenous Administration of Coenzyme Q10 in Acute Period of Cerebral Ischemia Decreases Mortality by Reducing Brain Necrosis and Limiting Its Increase within 4 Days in Rat Stroke Model. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (12): 1240.

References

- Törn AE, Hesselman S, Johansen K, Ågren J, Wikström A-K, Jonsson M. Outcomes in Children after Mild Neonatal Hypoxic Ischaemic Encephalopathy: A Population-Based Cohort Study. *BJOG Int. J Obstet Gynaecol.* 2023.
- Caramelo I, Coelho M, Rosado M, Cardoso CMP, Dinis A, Duarte CB, et al. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review. *World J Pediatr.* 2023; 19: 505–48.
- Abate BB, Bimerew M, Gebremichael B, Mengesha Kassie A, Kassaw M, Gebremeskel T, et al. Effects of therapeutic hypothermia on death among asphyxiated neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *PLoS One.* 2021; 16 (2): e0247229.
- Sun YJ, Zhang ZY, Fan B, Li GY. Neuroprotection by Therapeutic Hypothermia. *Front Neurosci.* 2019; 13: 586.
- Korf JM, McCullough LD, Caretti V. A narrative review on treatment strategies for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Transl Pediatr.* 2023; 12: 1552–71.
- DuPont TL, Chalak LF, Morriss MC, Burchfield PJ, Christie L, Sánchez PJ. Short-Term Outcomes of Newborns with Perinatal Acidemia Who Are Not Eligible for Systemic Hypothermia Therapy. *J Pediatr.* 2013; 162: 35–41.
- Prempunpong C, Chalak LF, Garfinkle J, Shah B, Kalra V, Rollins N, et al. Prospective Research on Infants with Mild Encephalopathy: The PRIME Study. *J Perinatol.* 2018; 38: 80–85.
- She HQ, Sun YF, Chen L, Xiao QX, Luo BY, Zhou HS, et al. Current analysis of hypoxic-ischemic encephalopathy research issues and future treatment modalities. *Front Neurosci.* 2023; 17: 1136500.
- Landucci E, Pellegrini-Giampietro DE, Facchinetti F. Experimental Models for Testing the Efficacy of Pharmacological Treatments for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Biomedicines.* 2022; 10 (5): 937.
- Tokareva A, Starodubtseva N, Frankevich V, Silachev D. Minimizing Cohort Discrepancies: A Comparative Analysis of Data Normalization Approaches in Biomarker Research. *Computation.* 2024; 12: 137.
- Eldarov C, Starodubtseva N, Shevtsova Y, Goryunov K, Ionov O, Frankevich V, et al. Dried Blood Spot Metabolome Features of Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: A Neonatal Rat Model *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 8903.
- Shevtsova Y, Starodubtseva N, Tokareva A, Goryunov K, Sadekova A, Vedikhina I, et al. Metabolite Biomarkers for Early Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: An Experimental Study Using the NeoBase 2 MSMS Kit in a Rat Model. *Int J Mol Sci.* 2024; 25: 2035.
- Shevtsova Y, Eldarov C, Starodubtseva N, Goryunov K, Chagovets V, Ionov O, et al. Identification of Metabolomic Signatures for Ischemic Hypoxic Encephalopathy Using a Neonatal Rat Model. *Children.* 2023; 10: 1693.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497–509.
- Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Normalization Methods for Reducing Interbatch Effect without Quality Control Samples in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Studies. *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413: 3479–86.
- Tokareva AO, Chagovets VV, Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Nikolaev EN, Frankevich VE. Comparison of the Effectiveness of Variable Selection Method for Creating a Diagnostic Panel of Biomarkers for Mass Spectrometric Lipidome Analysis. *J Mass Spectrom.* 2021; 56: e4702.
- Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Nicolai R, Calvani M, et al. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: Relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *International Journal of Cardiology.* 2006; 54–60.
- Fantini J, Yahi N. Chapter 3 — Lipid Metabolism and Oxidation in Neurons and Glial Cells. In: Jacques Fantini, Nouara Yahi, editors. *Brain Lipids in Synaptic Function and Neurological Disease.* Academic Press, 2015; p. 53–85.
- Hahnefeld L, Vogel A, Gurke R, Geisslinger G, Schäfer MKE, Tegeder I. Phosphatidylethanolamine Deficiency and Triglyceride Overload in Perilesional Cortex Contribute to Non-Goal-Directed Hyperactivity after Traumatic Brain Injury in Mice. *Biomedicines.* 2022; 10: 914.
- Duranti A, Beldarrain G, Álvarez A, Sbriscia M, Carloni S, Balduini W. et al. The Endocannabinoid System as a Target for Neuroprotection/Neuroregeneration in Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Biomedicines.* 2022; 11 (1): 28.
- Sagredo O, Palazuelos J, Gutierrez-Rodriguez A, Satta V, Galve-Roperh I, Martínez-Orgado J. Cannabinoid signalling in the immature brain: Encephalopathies and neurodevelopmental disorders. *Biochem Pharmacol.* 2018; 157: 85–96.
- Fernández-Ruiz J, Moro MA, Martínez-Orgado J. Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: From preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics.* 2015; 12: 793–806.
- Xing C, Huang X, Wang D, et al. Roles of bile acids signaling in neuromodulation under physiological and pathological conditions. *Cell Biosci.* 2023; 13: 106.
- Yeo Xin Yi, Tan Li Yang, Chae Woo Ri, Lee Dong-Yup, Lee Yong-An, Wuestefeld Torsten. Liver's influence on the brain through the action of bile acids. *Frontiers in Neuroscience.* 2023; 17.
- Kletkiewicz H., Wojciechowski MS., Rogalska J. Cannabidiol effectively prevents oxidative stress and stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) in an animal model of global hypoxia. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 15952.
- Kong W, Lu C. Role of mitochondria in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Histol Histopathol.* 2024; 39 (8): 991–1000.
- Baldari B, De Simone S, Cipolloni L, Frisoni P, Alfieri L, D'Errico S, et al. Oxidative Stress Markers in Human Brain and Placenta May Reveal the Timing of Hypoxic-Ischemic Injury: Evidence from an Immunohistochemical Study. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (15): 12221.
- Hennebelle M, Zhang Z, Metherell AH, et al. Linoleic acid participates in the response to ischemic brain injury through oxidized metabolites that regulate neurotransmission. *Sci Rep.* 2017; 7: 4342.
- Blondeau N, Lipsky RH, Bourourou M, Duncan MW, Gorelick PB, Marini AM, Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties — Ready for Use in the Stroke Clinic? *BioMed Research International.* 2015; 519830.
- Obolenskaia ON, Gorodetskaya EA, Kalenikova EI, Belousova MA, Gulyaev MV, Makarov VG, et al. Intravenous Administration of Coenzyme Q10 in Acute Period of Cerebral Ischemia Decreases Mortality by Reducing Brain Necrosis and Limiting Its Increase within 4 Days in Rat Stroke Model. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (12): 1240.

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ ПРОТОКОЛА У ДЕТЕЙ С РИСКОМ ИНВАЗИВНОГО МИКОЗА ЕСММ EQUAL SCORES

У. В. Лукаш^{1,2}, А. В. Власова^{1,2}✉, В. В. Горев¹, О. А. Тиганова¹, А. А. Быстрова¹, М. М. Каменев¹, К. А. Хасанова¹, Н. П. Денисенко², Д. А. Сычев²

¹ Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Для улучшения качества лечения инвазивных микозов и оценки соблюдения диагностического алгоритма в 2018 г. предложен метод ЕСММ (EQUAL Scores). Практический опыт применения у детей в настоящее время не представлен. Целью работы было оценить распространенность инвазивного микоза в детском стационаре, атрибутивную летальность у детей с инвазивным микозом и проанализировать динамику потребления противогрибковых препаратов. Разнонаправленное наблюдательное исследование выполнено в течение двух лет: ретроспективная часть в период с 01.01.2022 по 31.12.2022 и проспективная — с 01.01.2023 по 31.08.2024. Оценку соответствия противогрибковой профилактики и эмпирической терапии инвазивного микоза установленной группе риска пациента проводили методом ЕСММ (EQUAL Scores), оценку потребления противогрибковых препаратов — методом АТС/ДДД-анализа. За период наблюдения в течение 20 месяцев выжили 78 детей, умерли — 20, наблюдение продолжается. Атрибутивная летальность составила 25,6%. Средневзвешенная абс. оценка по методу ЕСММ (EQUAL Scores) для кандидоза составила 8,4 (38%), для аспергиллеза — 6,6 (24%) и для мукормикоза — 9,85 (31%) от допустимой. Изучена динамика потребления противогрибковых препаратов методом АТС/ДДД-анализа за 2022 и 2023 г. «до» и «после». Сделан вывод, что внедрение метода ЕСММ для диагностики инвазивного микоза привело к значительному увеличению числа выявленных случаев с 5 случаев в год до 98 случаев в год со снижением атрибутивной летальности с 60% до 25,6% соответственно. Индекс NNT при использовании метода ЕСММ составил 2,9. До внедрения метода ЕСММ потребление противогрибковых препаратов в 2022 г. составляло 30,3 ЧДТ (в стандартизованной суточной дозе) на 100 койко-дней, после внедрения в 2023 г. — 54,7 ЧДТ (в стандартизованной суточной дозе) на 100 койко-дней.

Ключевые слова: педиатрия, микоз, инвазивный, клиническое исследование, противогрибковый, риски микоза

Финансирование: публикация подготовлена в рамках научного гранта при поддержке АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении».

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России (протокол № 10 от 25 сентября 2024 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Анна Викторовна Власова
4-й Добрынинский пер., д. 1/9, г. Москва, 119049, Россия; annavlasova75@mail.ru

Статья получена: 15.11.2024 **Статья принята к печати:** 06.12.2024 **Опубликована онлайн:** 26.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.067

EXPERIENCE OF IMPLEMENTATION OF ECMM EQUAL SCORES IN TREATMENT OF CHILDREN AT RISK OF INVASIVE MYCOSIS

Lukash UV^{1,2}, Vlasova AV^{1,2}✉, Gorev VV¹, Tiganova OA¹, Bystrova AA¹, Kamenev MM¹, Khasanova KA¹, Denisenko NP², Sychev DA²

¹ Morozovskaya Children's City Clinical Hospital under the Moscow City Department of Health, Moscow, Russia

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education under the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The ECMM EQUAL Scores tool was proposed in 2018 as a way to improve the quality of treatment of invasive mycoses and assess compliance with the diagnostic algorithm. Currently, there are no reports of its practical application in pediatrics. This study aimed to assess the prevalence of invasive mycosis in a pediatric hospital, the attributed mortality in children with invasive mycosis, and to analyze the dynamics of consumption of antifungal drugs. By design, the study was multidirectional observational, and spanned two years, with retrospective part over the period from 01.01.2022 to 31.12.2022, and prospective part — from 01.01.2023 to 31.08.2024. We used ECMM EQUAL Scores to evaluate the conformity of the fungal infection prevention measures and the empirical therapy to the established risk tier the patients were allocated to, and calculated the ATC/DDD index to measure the consumption of antifungal drugs. During the 20-month follow-up period, 78 children survived, 20 died; supervision continues. The attributed mortality rate was 25.6%. The weighted average absolute ECMM EQUAL Scores were as follows: for candidiasis — 8.4 (38%), for aspergillosis — 6.6 (24%), and for mucormycosis — 9.85 (31%). With the help of the ATC/DDD index, we assessed the dynamics of consumption of antifungal drugs in 2022 and 2023, the "before" and "after" periods. It was concluded that introduction of the ECMM tool into the invasive mycosis diagnostic routine significantly raised the number of detected cases (from 5 to 98 per year), and pushed down the attributed mortality from 60% to 25.6%. With ECMM EQUAL Scores, the NNT index was 2.9. Before introduction of the ECMM tool, in 2022, antifungal drugs were given for 30.3 DDD per 100 bed-days, after the introduction in 2023 — 54.7 DDD per 100 bed-days.

Keywords: pediatrics, mycosis, invasive, clinical trial, antifungal, mycosis risks

Funding: the publication was prepared as part of work under a research grant supported by the Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Russian Ministry of Health (Minutes #10 of September 25, 2024).

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna V. Vlasova
4-y Dobryninsky per. 1/9, Moscow, 119049, Russia; annavlasova75@mail.ru

Received: 15.11.2024 **Accepted:** 06.12.2024 **Published online:** 26.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.067

На долю инвазивных микозов приходится значительная часть осложнений и смертельных исходов у пациентов со злокачественными новообразованиями с нарушением иммунных функций или при проведении аллогенной

трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [1].

Клинические рекомендации по ведению инвазивных микозов в России не представлены. Верификация

диагноза инвазивного микоза с установлением этиологии возможна не в каждой медицинской организации [2, 3]. «Переползающая» противогрибковая терапия — назначение противогрибковых препаратов, не рекомендованных для эмпирической противогрибковой терапии пациентам, у которых не выполнен диагностический алгоритм с целью установления этиологии и локусов поражения [4]. «Переползающая» противогрибковая терапия у пациентов с подозрением на инвазивный микоз увеличивает риск возникновения нежелательных реакций и возможных лекарственных взаимодействий из-за чрезмерного назначения противогрибковых препаратов. Это также продлевает сроки госпитализации и может неблагоприятно сказываться на результате лечения основного заболевания и выживаемости пациентов [1, 3].

В 2018 г. был представлен метод ECMM (EQUAL Scores), который обеспечил системный подход к диагностике и улучшению качества лечения пациентов с инвазивными микозами. Согласно данным многоцентровых исследований, внедрение этого метода во взрослой популяции способствовало повышению выживаемости у пациентов с инвазивными микозами [5–7]. Однако практический опыт применения метода ECMM (EQUAL Scores) у детей на сегодняшний день не представлен. Одним из показателей успешного внедрения принципов корректной диагностики является оптимизация использования противогрибковых препаратов. Это было ранее продемонстрировано на примере оптимизации потребления антибиотиков [8]. Оптимизация использования противогрибковых препаратов может стать одним из индикаторов для динамической оценки эффективности внедрения данного метода ECMM (EQUAL Scores) [1–3]. Недоступность технологии метода ECMM (EQUAL Scores) в детском здравоохранении послужила основанием для формирования цели данного исследования.

Цель исследования — оценить распространенность инвазивного микоза у пациентов многопрофильного детского стационара, определить атрибутивную летальность в этой группе, а также проанализировать динамику потребления противогрибковых препаратов в процессе внедрения метода ECMM для оценки групп риска инвазивного микоза у пациентов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования

Наблюдательное разнонаправленное исследование состоит из ретроспективной и проспективной частей. В ретроспективное исследование включали пациентов обоего пола возрастом от месяца до 18 лет с установленным диагнозом инвазивного микоза за период с 01.01.2022 по 31.12.2022. В проспективной части запланировано включение 130 пациентов возрастом от месяца до 18 лет с установленным диагнозом инвазивного микоза за период с 01.01.2023 по 31.12.2025. Критерии включения: установленный диагноз инвазивного микоза в соответствии с критериями CDC. Критерии невключения: терминальные стадии недостаточности органов и систем как конкурирующих с инфекцией за основной диагноз или состояние. Критерии исключения: дети, находящиеся под опекой; предыдущая/сопутствующая терапия для включения в исследование значения не имеет. Диагноз инвазивного микоза должен быть установлен согласно критериям CDC и подразумевает наличие хотя бы

одного фактора хозяина с клиничко-рентгенологическими критериями. Анализ карт стационарных пациентов с установленным диагнозом инвазивного микоза проводится в системе КИС ЕМИАС. Оценка соответствия диагностики, лечения и контроля инвазивного микоза проводится с использованием метода ECMM (EQUAL Scores). Для диагностики инвазивных микозов проводили микробиологические методы исследования и микроскопию соответствующих жидких и плотных субстратов (образцы тканей и жидкостей), в том числе с калькофлюором белым для выявления септированного и несептированного мицелия. Всем пациентам проводили компьютерную томографию высокого разрешения различных органов, КТ органов грудной клетки, поскольку типичные признаки легочного инвазивного микоза при этом часто отсутствуют, даже атипичные легочные инфильтраты могут свидетельствовать о наличии легочного инвазивного микоза [4]. Для диагностики аспергиллеза применяли метод исследования на наличие галактоманнанового антигена (GalMAg-ИФА ELISA) в биологических жидкостях.

Всем пациентам с установленным диагнозом инвазивного микоза проводили генетическое исследование с использованием панели iPLEX Pro PGx (Agena Bioscience, США) 68 SNP/INDEL. «VeriDose® Core Panel» позволяет провести детекцию релевантных вариантов в генах *ABCB1*, *APOE*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *PNPLA5*, *SLCO1B1*, *SUL1A1*, которые потенциально могут влиять на метаболизм лекарственных веществ. Дополнительно к панели у пациентов определяли клинически значимые варианты генов *TPMT*, *ATIC*, *SLC19A1* методом аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени.

На всем протяжении проведения исследования по 31.12.2025 будет осуществляться динамический мониторинг неэффективности терапии, развития нежелательных реакции и летальных исходов у пациентов, включенных в исследование. При регистрации нежелательной реакции оценивается тяжесть проявлений, оценка причины, связь с антифунгальным препаратом.

Запланировано создание группы сравнения с включением 30 пациентов с онкологическим или онкогематологическим заболеванием, но без установленного диагноза инвазивного микоза, которым также будет проведено генетическое исследование на определение полиморфизмов генов-кандидатов. По итогам генетического исследования запланирован анализ ассоциаций полиморфизмов генов-кандидатов с неэффективностью антимикотической терапии, развитием нежелательных реакций и летальных исходов.

Комплексное наблюдательное исследование в детском онкологическом, онкогематологическом отделении и отделении трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ» проводили в течение двух лет, включая ретроспективный анализ за период с 01.01.2022 по 31.12.2022 и проспективный анализ с 01.01.2023 по 31.08.2024. В ретроспективной и проспективной частях исследования была проведена оценка соответствия противогрибковой профилактики и эмпирической терапии инвазивного микоза установленной группе риска пациентов с использованием метода ECMM (EQUAL Scores). Оценивали также динамику потребления противогрибковых препаратов за 12 месяцев 2022 и 2023 г. с применением АТС/ДДД-анализа. Улучшение методов диагностики инвазивного микоза включало разработку внутренних протоколов и алгоритмов, утвержденных приказом руководства (рис. 1). Для

Таблица 1. Критерии оценки в баллах по методу ECMM (EQUAL Scores)

Критерии оценки инвазивных микозов у пациентов (n = 98)	Кандидоз (n = 98)	Аспергиллез (n = 98)	Мукормикоз (n = 98)
	Максимальная оценка по критериям метода ECMM (EQUAL Scores), баллы		
ДИАГНОЗ Группа риска пациента Радиологические исследования Посевы Микроскопия Молекулярная диагностика Гистология Тест на галактоманнан для выявления аспергиллеза	10	15	18
ЛЕЧЕНИЕ Медикаментозная терапия (назначение этиотропного противогрибкового препарата) Хирургическое лечение (удаление пораженных тканей по показаниям)	10	5	8
КОНТРОЛЬ Радиологическое исследование локуса поражения в динамике Посев крови	2	7	6
Всего	22	27	32

диагностики аспергиллеза применяли метод определения галактоманнанового антигена в биологических жидкостях. Кроме того, была внедрена методика микроскопии биологических жидкостей и тканей с использованием специфического окрашивания калькофлюором белым [8–10].

Диагноз инвазивного микоза устанавливали при наличии факторов, влияющих на хозяина, а также клинкорентгенологических критериев [12–14]. К критериям, подтверждающим наличие инвазивного микоза, относится наличие хотя бы одного положительного результата из следующих исследований: микроскопического, гистопатологического, цитопатологического, микро-биологического, серологического или генетического, с последующей верификацией грибкового агента [15–17]. Стратификацию пациентов на группы риска по развитию инвазивных микозов осуществляли на основе факторов хозяина для мицелиальных и дрожжевых инвазивных микозов:

- нейтропения 4-й степени ($< 0,5 \times 10^9$ нейтрофилов в течение >10 дней);
- гематологические опухоли;
- реципиент алло-ТГСК или трансплантата солидного органа;
- применение глюкокортикостероидов (ГКС) в средней минимальной дозе 0,3 мг/кг/день в эквиваленте преднизолона более трех недель;
- лечение Т-клеточными иммунодепрессантами в течение последних 90 дней;
- лечение В-клеточными иммунодепрессантами (только для мицелиальных инвазивных микозов);
- наследственный тяжелый иммунодефицит (хроническая гранулематозная болезнь или тяжелый комбинированный иммунодефицит, дефицит сигнального белка и активатора транскрипции 3);
- острая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) III или IV степени с поражением кишечника, легких или печени, резистентная к первой линии терапии с помощью ГКС [3, 8, 11].

Методом ECMM (EQUAL Scores) была проведена количественная оценка качества диагностики и лечения инвазивного микоза различных типов, основанная на медицинских картах стационарных пациентов. Критерии оценки качества и максимальные баллы по каждому разделу указаны в табл.

Имеются данные об общей летальности при кандидемии во взрослой популяции, которая достигает 40%, несмотря на проводимую терапию противогрибковыми препаратами. Также в зависимости от вида грибов рода *Candida* общая летальность значительно различается: 7,7% — у *C. albicans*, 23,7% — у *C. glabrata*, 7,7% — у *C. parapsilosis* и 63,6% — у *C. tropicalis* [18]. В педиатрической популяции данные об общей летальности при кандидемии и при других видах микоза на данный момент отсутствуют. В рамках данного исследования на этапе внедрения алгоритмов ECMM атрибутивная летальность у пациентов составила 25,6%.

Проведен сравнительный анализ потребления противогрибковых лекарственных препаратов методом традиционного АТС/DDD-анализа за 2022 и 2023 г. по числу дней терапии в стандартизированной дозе на 100 койко-дней (ЧДТ на 100 койко-дней)

Принципы диагностики инвазивных микозов в настоящем протоколе представлены на рис. 1.

Статистические процедуры

Для проведения статистической обработки результатов исследования использовали пакет компьютерных программ IBM SPSS Statistics v26 (IBM, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В 2022 г. диагноз инвазивного микоза был поставлен пятерым детям в возрасте от месяца до 18 лет (троим мальчикам и двум девочкам) со средним возрастом 7,6 года. Из них двое детей продолжают лечение инвазивного аспергиллеза, трое детей скончались (два с инвазивным мукормикозом и один с аспергиллезом). Диагноз инвазивного микоза был установлен в соответствии с критериями CDC. Все пациенты, включенные в ретроспективный анализ, имели факторы хозяина мицелиальных и дрожжевых инвазивных микозов: из них двое детей получили аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в первый год без восстановления Т-клеточного звена иммунитета, а трое детей страдали от онкогематологических заболеваний и имели длительную нейтропению, получая при этом высокие дозы стероидов.

С 01.01.2023 по 31.08.2024 диагноз инвазивного микоза был установлен у 98 пациентов (56 мальчиков

Настоятельные рекомендации
высокая доказательность



Рис. 1. Алгоритм диагностики инвазивных микозов. Адаптировано из: Duane R. Hospenthal et al. 2023 [3]

и 42 девочки) в возрасте от месяца до 18 лет, со средним возрастом 12,4 года (13,0 лет). Среди них 36 пациентов прошли аллогенную трансплантацию ТГСК в первый год без восстановления Т-клеточного звена иммунитета, также принимавшие стероиды или несколько иммуносупрессивных препаратов. 45 пациентов страдали длительной нейтропенией, а 17 принимали высокие дозы стероидов. За период наблюдения в 20 месяцев выжили 78 детей, 20 пациентов погибли, и наблюдение продолжается. Атрибутивная летальность составила 25,6%. Эффективность профилактического применения противогрибковых препаратов по методу EQUAL Scores для предотвращения одного летального случая инвазивного микоза был проведен по индексу NNT — number needed to treat, согласно источнику [19].

Медиана балльной оценки по методу ЕСММ (EQUAL Scores) для инвазивного кандидоза составила 8,4 балла, что эквивалентно 38% от максимума. Для инвазивного аспергиллеза эта оценка составила 6,6 баллов (24% от максимума), а для инвазивного мукормикоза — 9,85 балла, что соответствует 31% от максимума. Распределение пациентов по основным заболеваниям представлено на рис. 2.

Диагноз инвазивного микоза был установлен в соответствии с критериями 1–6 стандартного определения случая инвазивного микоза [3]. В реальной практике диагностика потенциального инвазивного микоза с уточнением его локализации и этиологии у пациента с факторами хозяина начинается почти одновременно с эмпирической и превентивной (диагностической) противогрибковой терапией, поэтому ключевым направлением для улучшения клинической практики является стандартизация существующих алгоритмов диагностики

и рационального применения противогрибковых препаратов. Такой подход станет важным шагом в снижении распространенности негативных подходов, в том числе нерациональной практики «переползающей» противогрибковой терапии.

В 2022 г. наибольший объем потребления противогрибковых препаратов приходился на вориконазол (20,07 ЧДТ на 100 койко-дней) (рис. 3). За ним следовали флуконазол (4,59 ЧДТ на 100 койко-дней), амфотерицин В липосомный и липидный комплекс (2,54 ЧДТ на 100 койко-дней), позаконазол (2,05 ЧДТ), каспофунгин (0,47 ЧДТ на 100 койко-дней) и анидулафунгин (0,10 ЧДТ на 100 койко-дней).

В 2023 г. после внедрения метода ЕСММ потребление вориконазола оставалось доминирующим (32,9 ЧДТ на 100 койко-дней), за ним следовали флуконазол (9,33 ЧДТ на 100 койко-дней), амфотерицин В (липосомный и липидный комплекс) (4,63 ЧДТ), позаконазол (3,89 ЧДТ на 100 койко-дней), каспофунгин (2,10 ЧДТ на 100 койко-дней), изавуконазол (0,65 ЧДТ на 100 койко-дней) и микафунгин (0,28 ЧДТ на 100 койко-дней).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании ретроспективный анализ показал, что до внедрения метода ЕСММ в 2022 г. частота нецелесообразного применения противогрибковых препаратов «переползающей» терапии составляла 78%. После внедрения ЕСММ этот показатель снизился до 32%. Вместе с тем выявлено значительное увеличение потребления противогрибковых препаратов после внедрения метода ЕСММ. В 2022 г. суммарное применение составило 30,3 ЧДТ (число дней терапии в стандартизованной суточной дозе) на 100 койко-

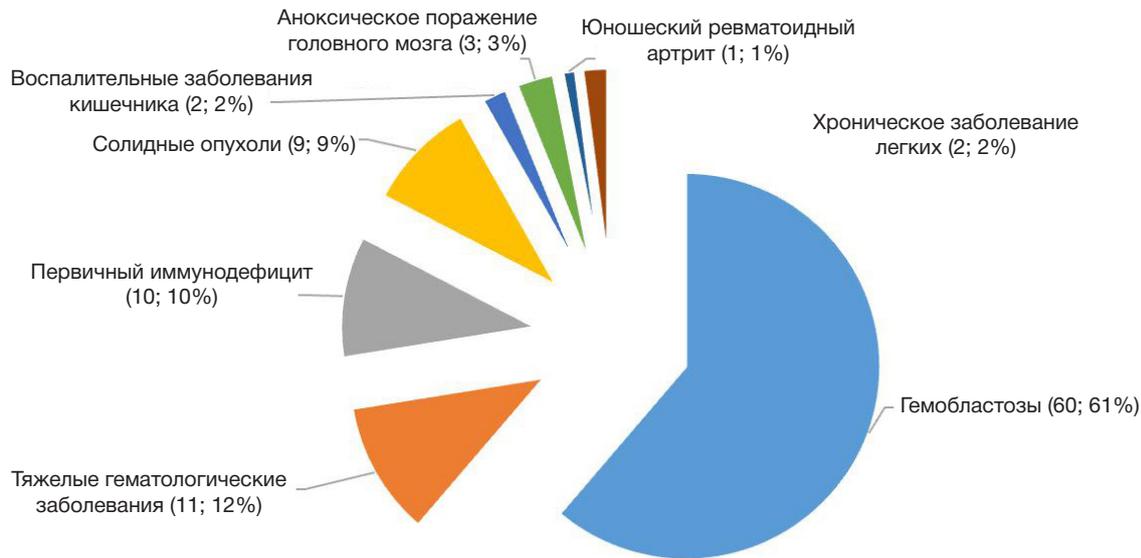


Рис. 2. Характеристика основных заболеваний у пациентов с диагнозом «Инвазивный микоз»

дней, а в 2023 г. после внедрения метода это значение возросло до 54,7 ЧДТ на 100 койко-дней. Рост потребления противогрибковых препаратов может быть связан с улучшением диагностики грибковых инфекций или изменением в клинической практике, которое способствовало более активному использованию противогрибковых препаратов для профилактики.

Несмотря на снижение доли «переползающей» терапии, общее потребление противогрибковых препаратов увеличилось в 1,8 раза по сравнению с 2022 г., за счет применения противогрибковых препаратов для пациентов с профилактической целью. Число детей, которым необходимо применить метод EQUAL Scores для предотвращения одного летального случая инвазивного микоза, составило 2,9 (NNT), поэтому в настоящем исследовании нами показана

эффективность метода и его следует рассмотреть для применения в клинической практике у детей.

Ограничения исследования

Отсутствие в РФ зарегистрированных реагентов для терапевтического мониторинга концентрации вориконазола и позаконазола ограничивает полное применение алгоритма ЕСММ в стационаре. Несмотря на это, результаты исследования, проведенного в данных условиях, остаются значимыми.

ВЫВОДЫ

Распространенность инвазивного микоза в 2023–2024 гг. в настоящем исследовании составила 1,5 случаев на

ЧДТ на 100 койко-дней

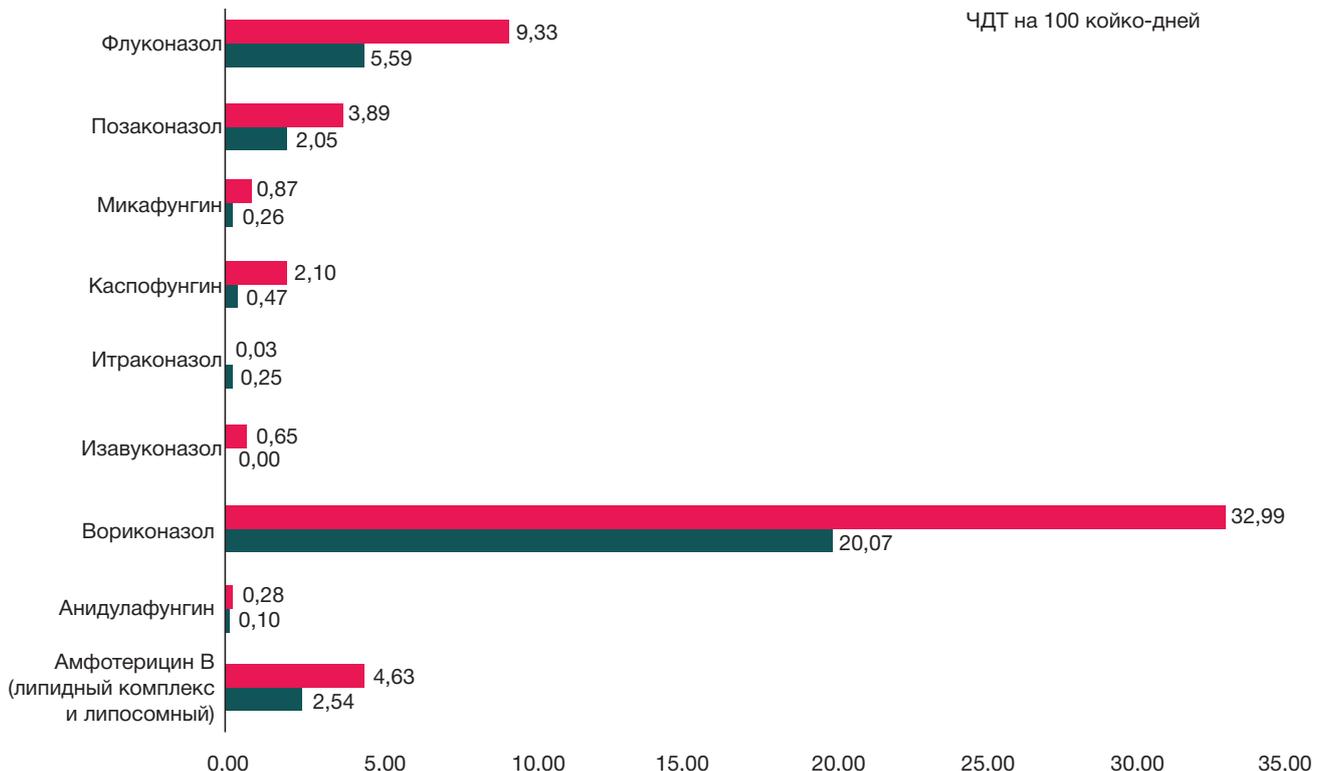


Рис. 3. Динамика потребления противогрибковых препаратов по наименованиям «до» и «после» внедрения метода ЕСММ (EQUAL Scores) в 2022–2023 гг.

100 000 госпитализированных пациентов. Внедрение метода ЕСММ для диагностики инвазивного микоза привело к значительному увеличению числа выявленных случаев (с пяти до 98 пациентов с 01.01.2023 по 31.08.2024) и снижению атрибутивной летальности с 60% до 25,6%. Индекс NNT, равный 2,9, указывает на то, что для предотвращения одной смерти от инвазивного микоза необходимо лечить примерно трех пациентов с помощью метода ЕСММ. В отличие от взрослой популяции, где общая летальность от кандидемии составляет 40%, данные о летальности при инвазивных микозах в педиатрической популяции отсутствуют. Применение противогрибковых препаратов возросло с 30,3 ЧДТ на 100 койко-дней в 2022 г. до 54,7 ЧДТ на 100 койко-дней в 2023 г. после внедрения метода ЕСММ. Использование метода ЕСММ для диагностики и лечения инвазивных микозов привело к увеличению потребления противогрибковых препаратов на 80% за год. Диагностика и лечение инвазивных микозов у детей основаны на тех же принципах, что и у взрослых. Результаты исследования показали, что данный метод ЕСММ (EQUAL Scores) значительно повышает эффективность

диагностики инвазивных микозов у детей. Мы наблюдали улучшение в выявляемости инвазивных микозов, что, в свою очередь, позволяет более точно соответствовать современным клиническим рекомендациям. Хотя внедрение метода ЕСММ привело к значительному снижению «переползающей» терапии с 78% в 2022 г. до 32% в 2023 г., уровень этого показателя, характеризующего негативную клиническую практику для противогрибковой терапии, остается высоким. Анализ потребления противогрибковых препаратов (ATC/DDD) до и после внедрения метода ЕСММ (EQUAL Scores) показал, что применение противогрибковых препаратов для профилактики и терапии потребовалось примерно половине госпитализированных пациентов. В настоящем исследовании нами показана эффективность метода ЕСММ (EQUAL Scores) у детей: для предотвращения одного летального случая инвазивного микоза потребовалось провести противогрибковую профилактику и эмпирическую терапию согласно ЕСММ-методу у 3 пациентов (индекс NNT составил 2,9). Метод ЕСММ (EQUAL Scores) следует рекомендовать для более широкого применения в клинической практике у детей.

Литература

- Lehrnbecher T, Robinson PD, Ammann RA, Fisher B, Patel P, Phillips R, et al. Guideline for the Management of Fever and Neutropenia in Pediatric Patients With Cancer and Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: 2023 Update. *J Clin Oncol*. 2023.
- Koenig C, Lehrnbecher T. Diagnostics and Therapy of Paediatric Patients with Febrile Neutropenia. *EJC Paediatric Oncology*, 2023.
- Hospenthal DR, Rinaldi MG, J Thomas. Walsh Diagnosis and Treatment of Fungal Infections, 2023.
- Groll AH, et al. 8th European Conference on Infections in Leukaemia: 2020 guidelines for the diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or post-haematopoietic cell transplantation. *Lancet Oncol*. 2021; 22: e254–e269.
- Hoening M, Salmanton-García J, et al. Guideline adherence and survival of patients with candidaemia in Europe: results from the ECMM Candida III multinational European observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2023; 23 (6): 751–61.
- Cornely OA, Koehler P, Arenz D, C Mellinghoff S. EQUAL Aspergillosis Score 2018: An ECMM score derived from current guidelines to measure QUALity of the clinical management of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, 2018.
- El Zakhem A, El Eid R, Istambouli R, Tamim H, Kanj SS. The Utility of EQUAL Candida Score in Predicting Mortality in Patients with Candidemia. *J Fungi (Basel)*. 2022; 8 (3): 238.
- Власова А. В., Смирнова Е. В., Волкова Н. Н., Дымнова Л. В., Анджель А. Е., Романова Ю. В., и др. Результаты пилотного проекта управления антимикробной терапией в детском стационаре. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2023; 67 (5).
- EQUAL Score 2018: An ECMM Score Derived From Current Guidelines to Measure QUALity of Clinical Invasive Mycosis.
- Warris A, Lehrnbecher T, Rollides E, Castagnola E, Brüggemann RJM, Groll AH. ESCMID-ECMM guideline: diagnosis and management of invasive aspergillosis in neonates and children.
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Vehreschild MJGT, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline
- 8-я Европейская конференция по инфекциям при лейкозах: руководство 2020 года по диагностике, профилактике и лечению инвазивных микозов у педиатрических пациентов со злокачественными новообразованиями или после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (Пересмотр от 2023 года).
- Keighley C, Cooley L, Morris AJ, Ritchie D, Clark JE, Boan P, Worth LJ. Consensus guidelines for the diagnosis and management of invasive candidiasis in haematology, oncology and intensive care settings, 2021.
- Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines, 2014.
- Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America.
- ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp.
- Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium.
- Salmanton-García J, Cornely OA, Stemler J, etc. Attributable mortality of candidemia — Results from the ECMM Candida III multinational European Observational Cohort Study. *J Infect*. 2024; 89 (3): 106229. DOI: 10.1016/j.jinf.2024.106229. Epub 2024 Jul 16. PMID: 39025408.
- Kane SP. Number Needed to Treat (NNT) Calculator. Available from: <https://clincalc.com/stats/nnt.aspx>. Updated June 23, 2024. Accessed October 24, 2024.

References

- Lehrnbecher T, Robinson PD, Ammann RA, Fisher B, Patel P, Phillips R, et al. Guideline for the Management of Fever and Neutropenia in Pediatric Patients With Cancer and Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: 2023 Update. *J Clin Oncol*. 2023.
- Koenig C, Lehrnbecher T. Diagnostics and Therapy of Paediatric Patients with Febrile Neutropenia. *EJC Paediatric Oncology*, 2023.
- Hospenthal DR, Rinaldi MG, J Thomas. Walsh Diagnosis and Treatment of Fungal Infections, 2023.
- Groll AH, et al. 8th European Conference on Infections in Leukaemia: 2020 guidelines for the diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or post-haematopoietic cell transplantation. *Lancet Oncol*.

- 2021; 22: e254–e269.
5. Hoenigl M, Salmanton-García J, et al. Guideline adherence and survival of patients with candidaemia in Europe: results from the ECMM Candida III multinational European observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2023; 23 (6): 751–61.
 6. Cornely OA, Koehler P, Arenz D, C Mellinghoff S. EQUAL Aspergillosis Score 2018: An ECMM score derived from current guidelines to measure QUALity of the clinical management of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses*, 2018.
 7. El Zakhem A, El Eid R, Istambouli R, Tamim H, Kanj SS. The Utility of EQUAL Candida Score in Predicting Mortality in Patients with Candidemia. *J Fungi (Basel)*. 2022; 8 (3): 238.
 8. Vlasova AV, Smirnova EV, Volkova NN, Dymnova LV, Andzhel AE, Romanova YuV, i dr. Rezul'taty pilotnogo proekta upravlenija antimikrobnaj terapije v detskom stacionare. *Zdravoohranenie Rossijskoj Federacii*. 2023; 67 (5). Russian.
 9. EQUAL Score 2018: An ECMM Score Derived From Current Guidelines to Measure QUALity of Clinical Invasive Mycosis.
 10. Warris A, Lehmbacher T, Roilides E, Castagnola E, Brüggemann RJM, Groll AH. ESCMID-ECMM guideline: diagnosis and management of invasive aspergillosis in neonates and children.
 11. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikian-Akdagli S, Vehreschild MJGT, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline
 12. 8-ja Evropejskaja konferencija po infekcijam pri lejkozah: rukovodstvo 2020 goda po diagnostike, profilaktike i lecheniju invazivnyh mikoza u pediatričeskih pacientov so zlokachestvennymi novoobrazovanijami ili posle transplantacii gemopojetičeskih stvolovyh kletok (Peresmotr ot 2023 goda). Russian.
 13. Keighley C, Cooley L, Morris AJ, Ritchie D, Clark JE, Boan P, Worth LJ. Consensus guidelines for the diagnosis and management of invasive candidiasis in haematology, oncology and intensive care settings, 2021.
 14. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines, 2014.
 15. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America.
 16. ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp.
 17. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium.
 18. Salmanton-García J, Cornely OA, Stemler J, etc. Attributable mortality of candidemia — Results from the ECMM Candida III multinational European Observational Cohort Study. *J Infect.* 2024; 89 (3): 106229. DOI: 10.1016/j.jinf.2024.106229. Epub 2024 Jul 16. PMID: 39025408.
 19. Kane SP. Number Needed to Treat (NNT) Calculator. Available from: <https://clincalc.com/stats/nnt.aspx>. Updated June 23, 2024. Accessed October 24, 2024.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИСФУНКЦИИ НИЖНИХ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ У ЖЕНЩИН С РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Е. И. Лузанова¹✉, М. И. Карпова¹, О. С. Абрамовских¹, Е. А. Четвернина¹, С. В. Куприянов^{1,2}, М. А. Зотова¹, А. В. Бершадский³¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия² Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия³ Центр медицинской реабилитации ООО «Клиника Института Мозга», Березовский, Россия

Рассеянный склероз (РС) — хроническое заболевание центральной нервной системы, преимущественно поражающее молодых женщин. Нейрогенная дисфункция нижних мочевыводящих путей (ДНМП) — одно из проявлений заболевания, оно создает риски инфекционных осложнений и поражения почек. В настоящее время недостаточно данных о составе микрофлоры мочи, полученных современными высокотехнологичными методами диагностики. Целью исследования было дать клиническую оценку ДНМП при РС, влияния ее на качество жизни (КЖ), а также уточнить данные о составе микрофлоры мочи. Для обследования 33 женщин с РС в возрасте 36 [39,5; 30,5] лет использовали специализированные опросники для оценки частоты и степени тяжести ДНМП, оценки уровня КЖ. Качественный и количественный состав условно-патогенной микрофлоры (УПМ) мочи определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. У 19 (57,6%) женщин с РС были симптомы ДНМП: симптомы фазы накопления (15 человек, 45,5%) и фазы опорожнения (16 человек, 48,5%). Почти у половины женщин с РС жалобы включали симптомы нарушения обеих фаз работы мочевого пузыря (12 человек, 36,4%), преобладали среднетяжелые нарушения (12 человек, 34,6%). Женщины с РС и ДНМП были более инвалидизированы согласно шкале EDSS (3,5 [5,0; 3,0] баллов; $p < 0,001$) и имели больший стаж болезни (13 [20,0; 5,0] лет; $p < 0,001$). Индекс КЖ у женщин с ДНМП отражал неудовлетворенность функцией мочевого пузыря. В результате исследования выявлено наличие бактериурии у пациенток с РС и ДНМП. Представлены данные о составе микрофлоры мочи: в 8 образцах от женщин с РС и ДНМП обнаружены представители УПМ (бактерии группы ESKAPE). Бактериурия имела бессимптомный характер.

Ключевые слова: рассеянный склероз, бактериурия, инфекции мочевых путей, нейрогенная дисфункция мочеиспускания, nocturia, микрофлора мочи

Финансирование: работа выполнена в рамках проекта РНФ № 23-25-10076.

Вклад авторов: Е. И. Лузанова — клиническое исследование, анализ и интерпретация данных, написание статьи; М. И. Карпова, О. С. Абрамовских — дизайн исследования и руководство, окончательное утверждение рукописи; Е. А. Четвернина, М. А. Зотова — лабораторные исследования; С. В. Куприянов — статистический анализ данных; А. В. Бершадский — интерпретация данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава (протокол № 8 от 15 сентября 2023 г.). Все участницы подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Игоревна Лузанова
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092, Россия; estrochikova@yandex.ru

Статья получена: 21.10.2024 **Статья принята к печати:** 21.11.2024 **Опубликована онлайн:** 12.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.056

ASSESSMENT OF LOWER URINARY TRACT DYSFUNCTION IN WOMEN WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Luzanova EI¹✉, Karpova MI¹, Abramovskikh OS¹, Chetvernina EA¹, Kupriyanov SV^{1,2}, Zotova MA¹, Bershadskiy AV³¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia³ Medical Rehabilitation Center, Clinical Institute of Brain LLC, Berezhovsky, Russia

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disorder of the central nervous system affecting primarily young women. Neurogenic lower urinary tract dysfunction (NLUTD) represents one of the disease manifestations creating the risk of infectious complications and kidney disease. Today, there is insufficient data on the urinary microflora composition obtained by advanced high-tech diagnosis methods. The study aimed to perform clinical assessment of NLUTD associated with MS and its impact on the quality of life (QOL), as well as to clarify the data on the urinary microflora composition. A total of 33 women with MS aged 36 [39.5; 30.5] years were assessed using the customized questionnaires for estimation of the NLUTD prevalence and severity, as well as for QOL evaluation. Qualitative determination and quantification of urinary opportunistic microflora (OM) were performed using the real-time polymerase chain reaction. A total of 19 (57.6%) women with MS had symptoms of NLUTD: symptoms of the storage (15 individuals, 45.5%) and emptying (16 individuals, 48.5%) phases. In almost half of women with MS, the complaints included abnormalities of both bladder functioning phases (12 individuals, 36.4%); moderate abnormalities prevailed (12 individuals, 34.6%). Women with MS and NLUTD were more disabled based on the EDSS score (3.5 [5.0; 3.0] points; $p < 0.001$) and had longer disease duration (13 [20.0; 5.0] years; $p < 0.001$). The QOL index of women with NLUTD showed dissatisfaction with bladder function. The study revealed bacteriuria in patients with MS and NLUTD. The data on the urinary microflora composition are provided: OM members (bacteria of the ESKAPE group) have been found in 8 samples obtained from women with MS and NLUTD. Bacteriuria was asymptomatic.

Keywords: multiple sclerosis, bacteriuria, urinary tract infections, neurogenic bladder dysfunction, nocturia, urinary microflora

Funding: the study was conducted as part of the RSF project No. 23-25-10076.

Author contribution: Luzanova EI — clinical assessment, data analysis and interpretation, manuscript writing; Karpova MI, Abramovskikh OS — study design and supervision, approval of the final version of the manuscript; Chetvernina EA, Zotova MA — laboratory tests; Kupriyanov SV — statistical analysis; Bershadskiy AV — data interpretation.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University (protocol No. 8 dated 15 September 2023). All subjects submitted the informed consent to enrollment.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina I. Luzanova
Vorovsky, 64, Chelyabinsk, 454092, Russia; estrochikova@yandex.ru

Received: 21.10.2024 **Accepted:** 21.11.2024 **Published online:** 12.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.056

Рассеянный склероз (РС) — хроническое демиелинизирующее нейровоспалительное и аутоиммунное заболевание центральной нервной системы (ЦНС) с явлениями дегенерации, имеющее варьибельное течение. Как правило, оно поражает людей в молодом возрасте, оказывает огромное влияние на качество жизни (КЖ) и накладывает заметное бремя на службы здравоохранения.

Дисфункция нижних мочевых путей (ДНМП) — распространенный симптом многоочагового поражения ЦНС, лежащего в основе развития РС. В среднем нейрогенная дисфункция нижних мочевых путей (НДНМП) развивается через 8 лет после постановки диагноза РС, до 10% пациентов имеют жалобы на изменение мочеиспускания при манифестации заболевания [1, 2]. В течение заболевания более 80% людей с РС испытывают симптомы НДНМП и до 91% имеют соответствующую патологию уродинамики [2, 3]. У 35% пациентов с РС очаги, повреждающие ретикулоспинальные тракты, как правило, приводят к детрузорно-сфинктерной диссинергии [4–6]. Данный синдром характеризуется нарушением координации между сокращением детрузора и расслаблением сфинктеров мочевого пузыря, что приводит к затруднению процесса мочеиспускания [7]. Клинически эти нарушения уродинамики проявляются неконтролируемыми сверхактивными сокращениями детрузора с недержанием мочи или без него, дисфункцией сфинктера, что часто приводит к значительному остаточному объему мочи и высокому внутрипузырному давлению. В рамках обструктивной симптоматики наиболее распространенными проявлениями являются снижение напора струи, затрудненное начало мочеиспускания и необходимость применения усилий для его осуществления. Это создает условия для функциональной обструкции и нарушения оттока мочи. Являясь крайними формами обструктивных нарушений, полная или частичная задержка мочеиспускания приводит к накоплению остаточной мочи [4]. В результате можно ожидать развития негативных последствий для нижних и верхних мочевыводящих путей. Высокое внутрипузырное давление способствует формированию рефлюкса в верхние мочевые пути и вторичному повреждению почек. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) представляют собой серьезную проблему при лечении людей, страдающих РС. Нейрогенное нарушение уродинамики ухудшает КЖ пациентов и предрасполагает к повышенному риску возникновения ИМП [8]. Обсуждая ИМП при РС, важно иметь в виду и вопросы профилактики. Факторы риска ИМП у пациентов с РС требуют тщательной клинической оценки. В качестве предикторов развития ИМП у человека с РС обсуждают длительную иммуносупрессивную терапию препаратами, изменяющими течение РС (ПИТРС), женский пол, тазовые расстройства и уровень инвалидизации, лечение кортикостероидами, дисбиотические процессы в урогенитальном тракте [1, 8]. На сегодняшний день состав микрофлоры НМП и смежных локусов недостаточно изучен у пациентов с РС. Целью исследования было провести клиническую оценку дисфункции нижних мочевыводящих путей, оценить ее влияние на КЖ с помощью специализированных валидированных в России опросников, изучить качественный и количественный состав микрофлоры НМП с применением молекулярно-генетических методов у женщин с РС.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проведено наблюдательное клинико-лабораторное исследование 33 небеременных женщин. Критерии

включения пациенток: наличие достоверного диагноза РС, согласно критериям МакДональда 2017 г.; уровень инвалидизации до 6,5 баллов; возраст от 18 до 45 лет включительно; на момент забора анализов или за месяц до включения отсутствие терапии глюкокортикостероидами и антибактериальными препаратами; отсутствие заболеваний, передающихся половым путем; отсутствие в анамнезе указаний на какое-либо заболевание мочевыводящей системы, на состояние на диспансерном учете у врача-уролога, врача-нефролога. Критерии исключения: беременность и лактация, острый инфекционный процесс, перенесенное оперативное вмешательство менее месяца назад, участие в иных исследованиях, психические расстройства, отказ от подписания добровольного информированного согласия. Набор осуществляли случайным образом среди амбулаторных пациентов, наблюдающихся в консультативно-диагностических кабинетах демиелинизирующих заболеваний и РС г. Челябинска и Челябинской области. Критерии включения в контрольную группу ($n = 20$): условно здоровые небеременные женщины репродуктивного возраста без заболеваний нервной системы, без нарушения функции тазовых органов и случаев урогенитальных инфекций в анамнезе; медиана возраста составила 35 [37,5; 30,0] лет. Клиническое обследование женщин с РС состояло из общепринятых и доступных врачу-неврологу методов: оценки неврологического статуса с применением Расширенной шкалы инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS), оценки функции тазовых органов с помощью «Опросника по функциям тазовых органов» [9, 10], и «Шкалы симптомов нейрогенного мочевого пузыря (The Neurogenic Bladder Symptom Score, NBSS) [11]. Медиана возраста женщин с РС составила 36 [39,5; 30,5] лет. Большинство пациенток принимали ПИТРС: 11 человек (33,3%) интерферон-бета, 11 (33,3%) — окрелизумаб, 6 (18,2%) — кладрибин и 5 (15,2%) были наивными. Медиана уровня инвалидизации составляла 2,5 [4,0; 2,0] балла по EDSS, все пациентки имели ремиттирующий тип течения.

Изучение состава микрофлоры мочи проводили набором реагентов для выявления ДНК условно-патогенных бактерий классов *Bacilli*, *Betaproteobacteria* и *Gamma proteobacteria* (БакСкрин УМП; «ДНК-Технология», Россия) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В моче производили количественную оценку бактериальной обсемененности (общую бактериальную массу, ОБМ), количество ДНК идентифицируемого микроорганизма представлено в виде десятичного логарифма Lg , значения которого пропорциональны микробной обсемененности биотопа. Используемый в данном исследовании набор позволяет обнаружить 25 бактериальных представителей условно-патогенной флоры: *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*; *Achromobacter ruhlandii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia spp.*; *Acinetobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacteriales*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Всем пациенткам с жалобами и симптомами ДНМП была рекомендована консультация уролога, ультразвуковое исследование мочевого пузыря (УЗИ) с определением объема

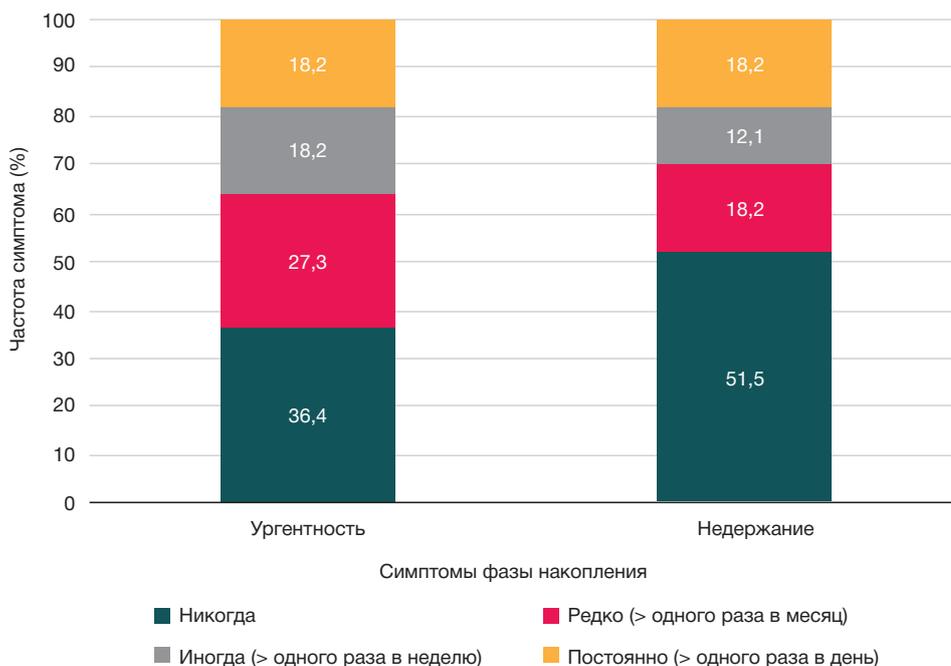


Рис. 1. Частота встречаемости симптомов фазы накопления у женщин с ремиттирующим РС согласно «Опроснику по функциям тазовых органов»

остаточной мочи (ОМ). Для статистического анализа использовали Windows 10, Excel 2016 (Microsoft США), IBM SPSS Statistics 26 (IBM, США). Описательная статистика включала частотные показатели, значения медианы, 25-го и 75-го перцентилей (Me [LQ; UQ]). При сравнении групп использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, Краскала–Уоллиса, критерий χ^2 . Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента Спирмена (ρ), для оценки силы связи применяли шкалу Чеддока. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использование «Опросника по функциям тазовых органов» выявило признаки расстройства мочеиспускания у 19 человек (57,6%) в разной степени выраженности. В группу исследования были включены пациентки с РС и ДНМП, разброс возраста составил 21–45 лет. В группу сравнения вошли 14 женщин с РС, которые не имели нарушения функции мочеиспускания, в возрасте от 19 до 42 лет включительно. Пациентки с ДНМП отличались по уровню инвалидизации от тех, у кого функция мочеиспускания была сохранна (3,5 [5,0; 3,0] и 2,0 [2,0; 1,0] баллов соответственно; $p < 0,001$), различий по возрасту не было. Женщины с ДНМП имели более длительное течение РС (13 [20,0; 5,0] лет) в сравнении с пациентками без расстройства микции (4 [7,0; 2,75] года; $p < 0,001$).

Симптомы фазы накопления присутствовали у 15 человек (45,5%), фазы опорожнения — у 16 человек (48,5%) (рис. 1, 2). Сочетание симптомов нарушения обеих фаз мочеиспускания наблюдалось у 12 человек (36,4%). У всех пациенток симптомы дисфункции мочевого пузыря развились после дебюта РС. Появление жалоб на нарушение мочеиспускания пациентки отмечали через 3 [5,0; 2,0] года от дебюта РС, наиболее поздний срок начала ДНМП составил 10 лет от постановки диагноза, минимальный стаж дисфункции микции составлял год. Неотложные позывы к мочеиспусканию чаще одного раза в неделю испытывали 12 женщин (36,4%), с разной частотой возникновения 12 женщин (36,4%) отметили, что «не могут

удерживать мочу при срочном позыве». В течение дня 10 и более раз мочились 7 человек (21,2%). Всего 3 женщины (9,1%) имели жалобы только на симптомы накопления. Более одного раза за ночь просыпались, чтобы помочиться, 6 женщин с РС (18,2%), все они имели и другие симптомы расстройства мочеиспускания. У пациенток без симптомов ДНМП ноктурия не встречалась.

Устойчивая обструктивная симптоматика, присутствующая как минимум несколько раз в неделю, была представлена жалобами на снижение скорости мочеиспускания у 14 человек (42,4%), ощущение слабого напора струи, увеличение времени, необходимого для опорожнения, — у 13 (39,4%); прерывистым свое мочеиспускание описали 13 человек (39,4%), 11 (33,3%) испытывали потребность тужиться для опорожнения мочевого пузыря, чувство неполного опорожнения после мочеиспускания отмечали 12 человек (36,4%). Имели жалобы исключительно на симптомы фазы опорожнения 4 женщины (12,1%). Недержание мочи при напряжении испытывали 4 женщины с РС (12,1%), в возрасте от 35 до 46 лет (медиана возраста — 40,5 [44,25; 36,0] лет), при этом у 3 женщин наблюдались и другие симптомы со стороны мочевого пузыря. Нарушение фазы накопления беспокоило 1 пациентку, 2 другие имели сочетанные жалобы. Из 19 женщин консультацию уролога получили 10 пациенток, у всех установлен диагноз ДНМП, согласно данным УЗИ мочевого пузыря с оценкой ОМ в одном случае выявлен объем, равный 160 мл.

Согласно индексу КЖ, женщины с РС и нарушением мочеиспускания были не удовлетворены функцией мочевого пузыря в сравнении с женщинами без данных симптомов, $p < 0,05$ (рис. 3). Медиана индекса КЖ составила 2,0 [2,0; 1,0] балла. Худшее значение индекса урологического КЖ имели пациентки с симптомами фазы накопления и сочетанными симптомами дисфункции мочеиспускания (2,0 [2,75; 2,0]; 2,0 [2,0; 1,0] баллов соответственно; $p > 0,05$).

Результаты оценки степени выраженности нарушения мочеиспускания представлены в таблице. По всем доменам шкалы NBSS выявлено повышение средних значений показателей. Величина общего балла NBSS выше

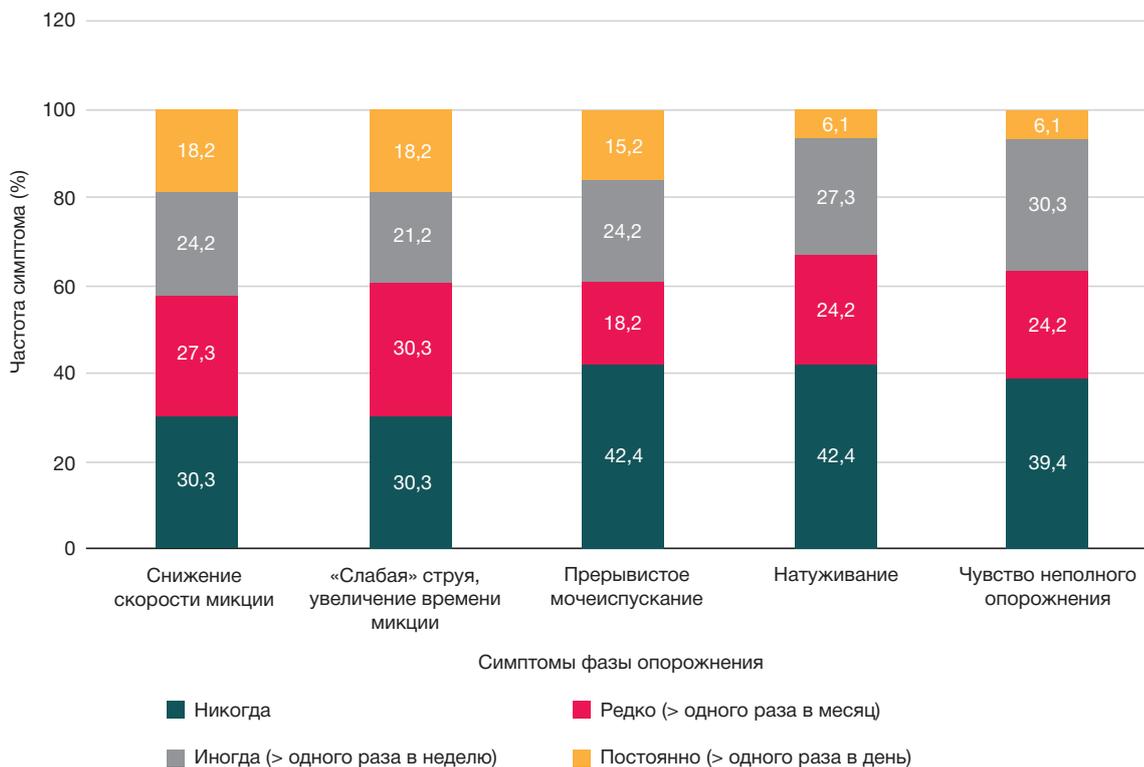


Рис. 2. Частота встречаемости симптомов фазы опорожнения у женщин с ремиттирующим РС согласно «Опроснику по функциям тазовых органов»

20 наблюдалась у 12 женщин (34,6%), что свидетельствует о средней степени тяжести расстройства функции мочевого пузыря, в пределах от 10 до 20 (низкая степень выраженности) — у 4 женщин (12,1%), остальные пациентки имели значение менее 10. Выявлены прямые слабые связи между степенью тяжести ДНМП согласно шкале NBSS, уровнем инвалидизации ($p = 349$; $p > 0,05$) и стажем заболевания ($p = 145$; $p > 0,05$).

Индекс КЖ отражал негативное влияние на самочувствие пациенток при любой клинической картине нарушения мочеиспускания, худший показатель имели женщины с сочетанием симптомов (3,0 [3,0; 2,0] баллов; $p > 0,05$). Почти треть женщин с РС (9 человек, 27,3%), имеющих ДНМП, указали, что «если всю оставшуюся жизнь мочевой пузырь будет работать так же, как сейчас» они будут чувствовать себя несчастными и неудовлетворенными.

Молекулярно-генетическое исследование мочи женщин с РС выявило ДНК условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) у 8 человек (24,2%). Были обнаружены микроорганизмы порядка *Enterobacteriales* (4 человека), в том числе *Enterobacter cloacae* (1 человек), *Escherichia coli* (1 человек), *Klebsiella pneumoniae* + *Klebsiella oxytoca* (1 человек); виды из порядка *Pseudomonadales*: *Acinetobacter spp.* (1 человек), а также виды класса *Bacilli*: *Staphylococcus spp.* (3 человека) и *Streptococcus spp.* (2 человека). У 3 женщин (9%) выявлено сочетание представителей всех идентифицируемых классов бактерий. Разброс количества обнаруженных УПМ составил 2,5–5,7 Lg, что соответствует $10^{2,5}$ – $10^{5,7}$ ГЭ/образец. В рамках проведенного анкетирования у всех 8 пациенток была выявлена обструктивная симптоматика, которая проявлялась снижением напора струи, необходимостью натуживания и прерывистостью мочеиспускания, среди них у 5 (62,5%) было сочетание симптомов накопления и опорожнения, у 6 (75%) в урологическом анамнезе эпизоды цистита. Всего 12 женщин (36,4%) с момента постановки диагноза РС имели эпизоды ИМП: циститы,

в том числе рецидивирующие, и 1 случай пиелонефрита. В моче контрольной группы микроорганизмы не найдены ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При РС пациенты и медицинские работники часто сталкиваются с важной междисциплинарной проблемой — нейроурологическими расстройствами. Ряд зарубежных авторов указывают, что характер нарушений микции при РС варьирует от гиперактивности (34–91% пациентов) до арефлексии детрузора (20–37% пациентов) [1, 2]. В недавно проведенном исследовании эпидемиологии и характера расстройств мочеиспускания при РС, НДНМП выявлена у 65% пациентов [12]. Среди наших пациенток более половины (57,6%) имели различные симптомы расстройства функции мочеиспускания. Наиболее распространенными симптомами и нарушениями являются частые позывы к мочеиспусканию и гиперактивность мочевого пузыря [13]. У обследованных женщин с РС симптомы накопления и опорожнения были представлены почти в равной степени, 45,5% и 48,5% соответственно, что в первую очередь обусловлено локализацией поражения ЦНС. Вероятно, этим можно объяснить отсутствие статистически достоверной корреляционной связи между стажем заболевания и тяжестью дисфункции мочеиспускания. Выраженность того или иного симптома РС определяется расположением очагов демиелинизации, тяжестью обострения и качеством восстановления функции после него. Расстройство мочеиспускания при РС вносит значительный вклад в уровень дезадаптации пациентов, увеличивая степень инвалидизации [12]. Женщины с РС и ДНМП были более инвалидизированы, по сравнению с теми, у кого функция мочеиспускания не нарушена. В то же время они имели легкую и среднюю степень тяжести расстройства функции мочевого пузыря, значимой корреляционной связи между уровнем EDSS и

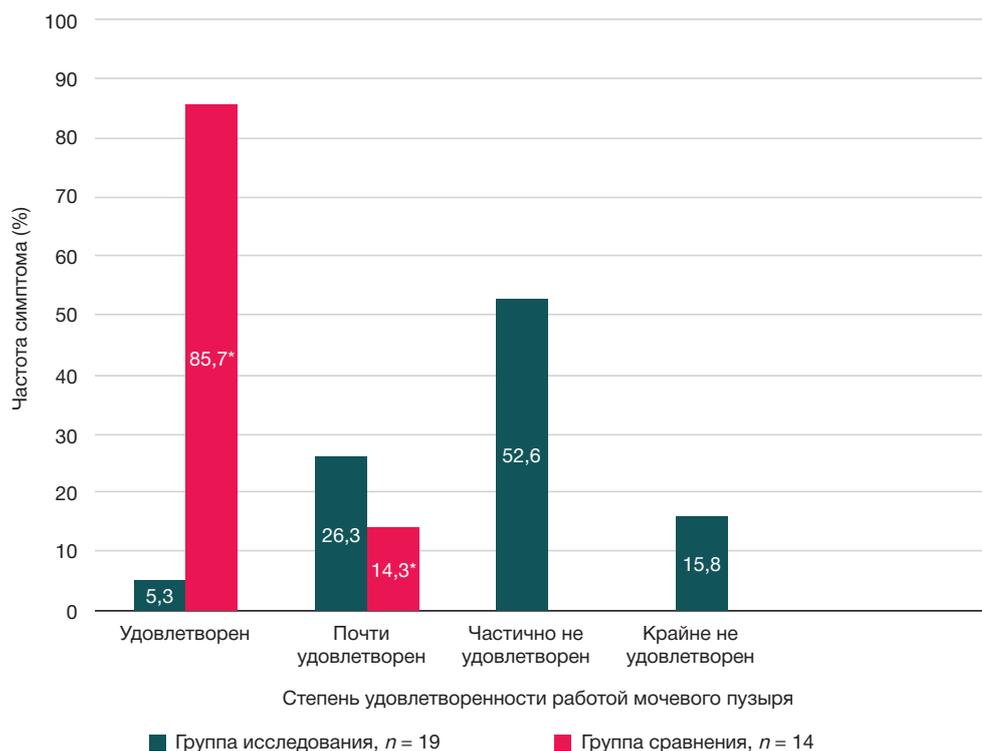


Рис. 3. Частота удовлетворенности работой мочевого пузыря (индекс КЖ) согласно Опроснику по функциям тазовых органов. * — $p < 0,05$, критерий χ^2

NBSS не обнаружено. Это согласуется с особенностями применения шкалы функциональной системы мочевого пузыря и кишечника и алгоритма определения общего балла по EDSS.

Важно, что немалая часть женщин (39,4%) имела нарушения мочеиспускания, при которых встречаются симптомы, связанные с трудностью удержания и опорожнения мочевого пузыря одновременно. Подобный вариант нейрогенного расстройства мочеиспускания развивается при наличии очагового поражения спинного мозга ниже моста (или продолговатого мозга) и выше крестцового отдела [14]. Следует отметить, около 80% пациентов с РС имеют очаги в спинном мозге, преимущественно в шейном отделе, которые чаще, чем поражения головного мозга, являются симптоматическими и могут вызывать значительную дезадаптацию в виде нарушения ходьбы, координации, функции мочевого пузыря и кишечника [3, 15, 16]. При сочетании симптомов опорожнения и накопления, как правило, пациенты обращают внимание именно на неотложные позывы и эпизоды недержания, обструктивные симптомы остаются вне поля зрения, и сохраняются условия для повреждения верхних мочевых путей. Одна из основных трудностей при диагностике затрудненного мочеиспускания — невозможность адекватной оценки его тяжести на основании субъективных жалоб пациента. В связи с этим целесообразно регулярно проводить скрининг на наличие нарушения фазы опорожнения, своевременно направлять на консультацию к урологу, проводить урофлоуметрию для количественной оценки скорости мочеиспускания, а также УЗИ мочевого пузыря для определения ООМ [5, 6].

В свою очередь, симптомы фазы накопления, как правило, отражающие нейрогенную детрузорную гиперактивность, также могут приводить к повреждению и расширению верхних мочевыводящих путей, развитию «нерефлюксных» пиелонефритов. Связано это с развитием фиброза в ткани детрузора, нарушением динамики мочевого пузыря [7, 17].

Увеличение частоты ночных мочеиспусканий у людей с РС является еще одним проявлением нарушения функции накопления и удержания мочи. Ноктурия ухудшает ночной сон, приводит к утомляемости, дневной сонливости, снижает КЖ [18, 19]. Распространенность ноктурии при РС выше, чем в популяции в целом, и колеблется от 20,9% до 48,8% [18]. Мы отметили, что более одного раза за ночь просыпались и ходили в туалет, чтобы помочиться 18,2% женщин с РС. В настоящее время обсуждают три различных механизма развития ноктурии: снижение емкости мочевого пузыря, общая полиурия и ночная полиурия [20, 21]. Известен широкий спектр причин, лежащих в основе этих трех патогенетических вариантов ноктурии, при РС описаны специфические факторы, не наблюдаемые у пациентов без неврологической патологии [20, 21].

Для оценки КЖ у людей с нейрогенной дисфункцией мочеиспускания разработаны специальные анкеты, определяющие индекс КЖ. Большинство исследователей РС вне зависимости от используемого инструмента оценки сходятся во мнении, что симптомы дисфункции мочеиспускания значительно влияют на КЖ пациентов [2, 12]. В российской популяции людей с РС проблема влияния дисфункции мочеиспускания на КЖ остается малоизученной, что, вероятно, во многом обусловлено тем, что специальные опросники были переведены на русский язык и валидированы не так давно [9, 11]. Согласно данным российского исследования по валидации краткой формы опросника КЖ больных с нейрогенными расстройствами мочеиспускания (SF-Qualiveen), пациенты с РС и нейрогенной ДНМП имели значительно более худший показатель КЖ [22]. В нашем исследовании каждая третья женщина с РС, имеющая дисфункцию мочеиспускания, указала на большую значимость для нее этой проблемы. Индекс КЖ из «Опросника по функциям тазовых органов» также отражал низкую удовлетворенность женщин с ДНМП качеством мочеиспускания в сравнении с теми пациентками, кто не имел подобных нарушений.

Таблица. Выраженность расстройства мочеиспускания у женщин с ремиттирующим РС по данным Шкалы симптомов нейрогенного мочевого пузыря (NBSS)

Женщины с РС и НДНМП n = 19	Средние значения баллов по доменам				Общий балл
	Недержание (0–29)	Накопление и опорожнение	Осложнения	Качество жизни	
	6,05 ± 5,43	10,08 ± 2,93	4,95 ± 4,36	2,1 ± 1,07	2,1 ± 8,85

На уровень КЖ и смертность людей с РС влияет не только основное заболевание, но и сопутствующие состояния, а также факторы образа жизни. Большую долю среди этих факторов составляют инфекции, особенно пневмония, грипп и ИМП [2]. Наличие ИМП у пациентов с РС тесно связано с наличием дисфункции мочеиспускания. ИМП являются одной из трех основных причин поступления в стационар пациентов с РС и достигают 30–50% от числа всех показаний для госпитализации [2, 8]. Согласно данным эпидемиологического исследования коморбидности РС, 3,5% от 815 пациентов имели ИМП [23]. Среди наших пациенток частота анамнестических указаний на ИМП составила 36,4%. В крупномасштабном ретроспективном исследовании причин смерти людей с РС, проведенном в Канаде за период с 1986 по 2013 г., ИМП были отмечены в 8% из 2153 случаев смерти как одна из основных причин гибели, в то время как среди населения в целом ИМП составили лишь 2% причин смерти [24].

При исследовании мочи больных РС с применением культуральных методов микробиологической диагностики выявлено, что наиболее частыми возбудителями ИМП были *Escherichia coli*, *Streptococcus beta-hemolytic B*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus coagulase-negative* [8, 25]. В научной литературе нам не встретились данные, полученные с применением современных методик, позволяющих определять некультивируемые бактерии из мочи пациентов с РС и нейрогенной дисфункцией. В ходе данной работы проведена молекулярно-генетическая идентификация УМП мочи с использованием тест-системы «БакСкрин УМП» у женщин с РС. Асимптомная бактериурия наблюдалась в 24,2% случаев. Выявлены следующие представители: *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter spp.*, а также виды *Staphylococcus spp.* и *Streptococcus spp.*. Все эти микроорганизмы способны вызывать ИМП [25, 26]. Более того, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus spp.*, обнаруженные в моче женщин с РС, относятся к группе особо значимых бактерий, названной ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* [27]. Эти бактерии, зачастую вызывающие тяжелые инфекции, обладают множественной устойчивостью к различным классам антибиотиков [28, 29]. ESKAPE-патогены внесены ВОЗ в приоритетный список возбудителей для создания новых антибактериальных препаратов или альтернативных способов лечения [27–29]. Разброс количества обнаруженных УМП составил $10^{2.5}$ – $10^{5.7}$ ГЭ/образец. Микробиологическая картина при НДНМП изменяется в зависимости от способа отведения мочи [30]. Все обследованные нами женщины мочились самостоятельно. Несмотря на ограниченное количество пациенток с выявленной УМП, нами был проведен детальный анализ симптоматики нарушений мочеиспускания в этой группе. Такой подход оказался актуальным в контексте понимания взаимосвязи между ИМП и различными расстройствами функции НМП. В нашем наблюдении все женщины с РС и обнаруженной бактериурией имели нарушение акта

мочеиспускания с обструктивными симптомами, а также эпизоды ИМП в анамнезе. Эти симптомы могут указывать на наличие нарушений в механизме мочеиспускания, которые, согласно современным исследованиям, могут быть связаны с детрузорно-сфинктерной диссинергией. Подобная форма нарушения мочеиспускания сочетает в себе симптомы накопления и признаки обструкции, в том числе остаточный объем мочи. Если задержка мочеиспускания и слабая струя могут привлечь внимание пациента, то остаточный объем после мочеиспускания часто не ощущается. Поэтому важно своевременно выявлять признаки нарушения опорожнения. Для более точной оценки выраженности этих нарушений необходимо проводить комплексное уродинамическое исследование, которое позволяет получить детальную информацию о функциональном состоянии НМП, включая динамику давления в мочевом пузыре и его объем [2]. Без этого исследования невозможно сделать окончательные выводы о степени и характере патологии. В одном из рассматриваемых случаев у пациентки с бактериурией был установлен значительный ООМ, составлявший 160 мл, и псевдодивертикулы по данным УЗИ. Эти находки могут свидетельствовать о длительном течении хронической задержки мочеиспускания, что, в свою очередь, может негативно сказываться на здоровье данной пациентки и предрасполагать к развитию инфекционных осложнений. Совместное наблюдение неврологом и урологом пациентов с НДНМП имеет важное значение для сохранения функции почек и предотвращения серьезных урологических, зачастую смертельных осложнений [2, 8].

Выводы

Расстройства мочеиспускания выявлены в 57,6% женщин с ремиттирующим РС. При клиническом обследовании у этой категории пациентов был использован специальный «Опросник по функциям тазовых органов», позволяющий неврологу детально оценить качество функционирования этой системы, провести скрининговую диагностику. С одинаковой частотой встречались симптомы фазы накопления и фазы опорожнения, при этом у большинства пациенток наблюдалось их сочетание. Преобладали расстройства функции НМП средней степени выраженности, значительно влияющие на КЖ. Особенностью нашего исследования является использование диагностического набора, позволяющего комплексно оценить качественный и количественный состав микрофлоры с акцентом на выявление широкого спектра УМП трех классов *Bacilli*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*, наиболее часто вызывающих внебольничные и госпитальные инфекции. Предварительные результаты оценки микрофлоры мочи свидетельствуют о наличии не только общеизвестной *Escherichia coli*, но и других представителей УМП, в том числе относящихся к группе особо значимых бактерий ESKAPE, зачастую резистентных к противобактериальным препаратам. У женщин с выявленной УМП преобладали симптомы обструкции. Это подчеркивает важность

своевременного выявления и коррекции функциональных расстройств НМП для предотвращения инфекционно-воспалительных заболеваний. Нарушение опорожнения мочевого пузыря, вероятно, является одной из

причин, способствующих активному росту бактерий. Необходимо дальнейшее исследование для установления дополнительных факторов риска инфекционных осложнений НМП при РС.

Литература

- Sakakibara R. Urinary Dysfunction in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Related Disorders. Handbook of Neurourology. Singapore, 2023: 737–45.
- Averbeck MA, Mehnert U, Al Mousa RT, Kessler TM. Epidemiology of Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction. Handbook of Neurourology. Singapore, 2023: 135–40.
- Vecchio M, Chiaramonte R, Di Benedetto P. Management of bladder dysfunction in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of studies regarding bladder rehabilitation. Eur J Phys Rehabil Med. 2022; 58 (3): 387–96. DOI: 10.23736/S1973-9087.22.07217-3.
- de Sèze M, Ruffion A, Denys P, Joseph PA, Perrouin-Verbe B. The neurogenic bladder in multiple sclerosis: review of the literature and proposal of management guidelines. Mult Scler. 2007; 13 (7): 915–28. DOI: 10.1177/1352458506075651.
- Шварц П. Г., Попов С. В., Завалишин И. А. Патофизиологические и нейрофармакологические особенности терапии хронической задержки мочи при рассеянном склерозе. Фарматека. 2017; 6 (339): 51–60.
- Шварц П. Г., Попов С. В. Нейрогенная хроническая задержка мочи у больных рассеянным склерозом. Трудный пациент. 2018; 16 (6): 61–64.
- Ozkan B, Demirkesen O, Durak H, Uygun N, Ismailoglu V, Cetinel B. Which factors predict upper urinary tract deterioration in overactive neurogenic bladder dysfunction? Urology. 2005; 66 (1): 99–104. DOI: 10.1016/j.urology.2005.02.009.
- Филиппова Е. С., Баженов И. В., Зырянов А. В. и др. Инфекции мочевыводящих путей у больных нейрогенным мочевым пузырем. Consilium Medicum. 2019; 21 (12): 139–44. DOI: 10.26442/20751753.2019.12.190676.
- Коршунова Е. С., Юсупова Д. Г., Зимин А. А. и др. Валидация опросника по функциям тазовых органов (Questionnaire on pelvic organ function) у неврологических больных в России. Андрология и генитальная хирургия. 2023; 24 (1): 90–99. DOI: 10.17650/2070-9781-2023-24-1-90-99.
- Sakakibara R, Shinotoh H, Uchiyama T, Sakuma M, Kashiwado M, Yoshiyama M, Hattori T. Questionnaire-based assessment of pelvic organ dysfunction in Parkinson's disease. Auton Neurosci. 2001; 92 (1–2): 76–85. DOI: 10.1016/S1566-0702(01)00295-8.
- Филиппова Е. С., Баженов И. В., Волкова Л. И., Москвина Е. Ю., Турова Е. Л., Попова Ю. В. Русскоязычная версия шкалы симптомов нейрогенного мочевого пузыря (NBSS). Урология. 2018; 6: 5–13. DOI: 10.18565/urology.2018.6.5-13.
- Зырянов А. В., Баженов И. В., Филиппова Е. С., Устинов Г. С., Турова Е. Л., Тореев И. О., Леушин Е. К. Эпидемиология и характер расстройств мочеиспускания у больных рассеянным склерозом. Вестник урологии. 2020; 8 (2): 29–36. DOI: 10.21886/2308-6424-2020-8-2-29-36.
- Bientinesi R, Campetella M, Nociti V, Bassi PF, Sacco E. Identification of brain structures involved in lower urinary tract symptoms and sexual dysfunctions in patients with multiple sclerosis. Glob J Med Res. 2021; 21 (2): 42–48.
- Mehnert U, van der Lely S, Seif M, Leitner L, Liechti MD, Michels L. Neuroimaging in Neuro-Urology. Eur Urol Focus. 2020; 6 (5): 826–37. DOI: 10.1016/j.euf.2019.12.006.
- Kreiter D, Postma AA, Hupperts R, Gerlach O. Hallmarks of spinal cord pathology in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 2024; 456: 122846. DOI: 10.1016/j.jns.2023.122846.
- Sastre-Garriga J, Pareto D, Battagliani M, Rocca MA, Ciccarelli O, Enzinger C, et al. MAGNIMS consensus recommendations on the use of brain and spinal cord atrophy measures in clinical practice. Nat Rev Neurol. 2020; 16 (3): 171–82. DOI: 10.1038/s41582-020-0314-x.
- Vega-P JM, Pascual LA. High-pressure bladder: an underlying factor mediating renal damage in the absence of reflux? BJU Int. 2001; 87 (6): 581–4. DOI: 10.1046/j.1464-410x.2001.00082.x.
- Peyronnet B, Krupp LB, Reynolds WS, Gamé X, Amarenco G, Cornu JN, et al. Nocturia in Patients With Multiple Sclerosis. Rev Urol. 2019; 21 (2–3): 63–73.
- Andersson K-E, Madersbacher H, Altaweel W, Vasudeva P, Igawa Y. Drug Treatment. Handbook of Neurourology. Singapore, 2023; p. 281–315.
- Van Kerrebroeck P, Andersson KE. Terminology, epidemiology, etiology, and pathophysiology of nocturia. Neurourol Urodyn. 2014; 33 (Suppl.1): S2–5. DOI: 10.1002/nau.22595.
- Kowalik CG, Cohn JA, Delpé S, Reynolds WS, Kaufman MR, Milam DF, et al. Nocturia: Evaluation and Current Management Strategies. Rev Urol. 2018; 20 (1): 1–6. DOI: 10.3909/riu0797.
- Филиппова Е. С., Баженов И. В., Москвина Е. Ю., Зырянов А. В., Борзунов И. В. Перевод и апробация русскоязычной версии опросника SF-Qualiveen. Урологические ведомости. 2019; 9: 100.
- Kapica-Topczevska K, Tarasiuk J, Chorąży M, Czarnowska A, Brola W, Szczepański M, et al. The epidemiology of comorbidities among multiple sclerosis patients in northeastern Poland. Mult Scler Relat Disord. 2020; 41: 102051. DOI: 10.1016/j.msard.2020.102051.
- Harding K, Zhu F, Alotaibi M, Duggan T, Tremlett H, Kingwell E. Multiple cause of death analysis in multiple sclerosis: A population-based study. Neurology. 2020; 94 (8): e820–e829. DOI: 10.1212/WNL.0000000000008907.
- Medeiros Junior WLG, Demore CC, Mazaró LP, de Souza MFN, Parolin LF, Melo LH, et al. Urinary tract infection in patients with multiple sclerosis: An overview. Mult Scler Relat Disord. 2020; 46: 102462. DOI: 10.1016/j.msard.2020.102462.
- Гребенкина П. В., Сельков С. А., Краева Л. А., Соколов Д. И. Взаимодействие бактерий группы ESKAPE и NK-клеток: взаимная регуляция и роль в развитии репродуктивных патологий. Инфекция и иммунитет. 2023; 13 (4): 609–626. DOI: 10.15789/2220-7619-CBE-15452.
- Miller WR, Arias CA. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. Nat Rev Microbiol. 2024; 22 (10): 598–616. DOI: 10.1038/s41579-024-01054-w.
- Ярец Ю. И. Патогенный потенциал бактерий группы ESKAPE, выделенных из ран: характеристика фено- и генотипических маркеров и возможность их практического применения. Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022; 20 (4): 400–13. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-4-400-413.
- Phé V, Chartier-Kastler E, Panicker JN. Management of neurogenic bladder in patients with multiple sclerosis. Nat Rev Urol. 2016; 13 (5): 275–88. DOI: 10.1038/nrurol.2016.53.
- Panicker JN, Fowler CJ. Lower urinary tract dysfunction in patients with multiple sclerosis. Handb Clin Neurol. 2015; 130: 371–81. DOI: 10.1016/B978-0-444-63247-0.00021-3.

References

- Sakakibara R. Urinary Dysfunction in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Related Disorders. Handbook of Neurourology. Singapore, 2023: 737–45.
- Averbeck MA, Mehnert U, Al Mousa RT, Kessler TM. Epidemiology

- of Neurogenic Lower Urinary Tract Dysfunction. Handbook of Neurourology. Singapore. 2023: 135–40.
3. Vecchio M, Chiaramonte R, Di Benedetto P. Management of bladder dysfunction in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of studies regarding bladder rehabilitation. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2022; 58 (3): 387–96. DOI: 10.23736/S1973-9087.22.07217-3.
 4. de Sèze M, Ruffion A, Denys P, Joseph PA, Perrouin-Verbe B. The neurogenic bladder in multiple sclerosis: review of the literature and proposal of management guidelines. *Mult Scler.* 2007; 13 (7): 915–28. DOI: 10.1177/1352458506075651.
 5. Shvarts PG, Popov SV, Zavalishin IA. Patofiziologicheskie i nejrofarmakologicheskie osobennosti terapii hronicheskoy zaderzhki mochi pri rassejannom skleroze. *Farmateka.* 2017; 6 (339): 51–60. Russian.
 6. Shvarts PG, Popov SV. Nejrogennaja hronicheskaja zaderzhka mochi u bol'nyh rassejannym sklerozom. *Trudnyj pacient.* 2018; 16 (6): 61–64. Russian.
 7. Ozkan B, Demirkesen O, Durak H, Uygun N, Ismailoglu V, Cetinel B. Which factors predict upper urinary tract deterioration in overactive neurogenic bladder dysfunction? *Urology.* 2005; 66 (1): 99–104. DOI: 10.1016/j.urolgy.2005.02.009.
 8. Filippova ES, Bazhenov IV, Zyryanov AV, Borzunov IV, et al. Infekcii mochevyvodjashhijh putej u bol'nyh nejrogennym mochevym puzyrem. *Consilium Medicum.* 2019; 21 (12): 139–44. DOI: 10.26442/20751753.2019.12.190676. Russian.
 9. Korshunova ES, Yusupova DG, Zimin AA, Pyatnitskaya TM, Zaitsev AB, Yatsko KA, et al. Validacija oprosnika po funkcijam tazovyh organov (Questionnaire on pelvic organ function) u nevrologicheskijh bol'nyh v Rossii. *Andrologija i genital'naja hirurgija.* 2023; 24 (1): 90–99. DOI: 10.17650/2070-9781-2023-24-1-90-99. Russian.
 10. Sakakibara R, Shinotoh H, Uchiyama T, Sakuma M, Kashiwado M, Yoshiyama M, Hattori T. Questionnaire-based assessment of pelvic organ dysfunction in Parkinson's disease. *Auton. Neurosci.* 2001; 92 (1–2): 76–85. DOI: 10.1016/S1566-0702(01)00295-8.
 11. Philippova ES, Bazhenov IV, Volkova LI, Moskvina EY, Turova EL, Popova YV. Russkojazychnaja versija shkaly simptomov nejrogennogo mochevogo puzyrya (NBSS). *Urologija.* 2018; 6: 5–13. DOI: 10.18565/urology.2018.6.5-13. Russian.
 12. Zyryanov AV, Bazhenov IV, Philippova ES, Ustinov GS, Turova EL, Toreyev IO, et al. Jepidemiologija i harakter rasstrojstv mocheispuskanija u bol'nyh rassejannym sklerozom. *Vestnik urologii.* 2020; 8 (2): 29–36. DOI: 10.21886/2308-6424-2020-8-2-29-36. Russian.
 13. Bientinesi R, Campetella M, Nociti V, Bassi PF, Sacco E. Identification of brain structures involved in lower urinary tract symptoms and sexual dysfunctions in patients with multiple sclerosis. *Glob J Med Res.* 2021; 21 (2): 42–48.
 14. Mehnert U, van der Lely S, Seif M, Leitner L, Liechti MD, Michels L. Neuroimaging in Neuro-Urology. *Eur Urol Focus.* 2020; 6 (5): 826–37. DOI: 10.1016/j.euf.2019.12.006.
 15. Kreiter D, Postma AA, Hupperts R, Gerlach O. Hallmarks of spinal cord pathology in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2024; 456: 122846. DOI: 10.1016/j.jns.2023.122846.
 16. Sastre-Garriga J, Pareto D, Battaglini M, Rocca MA, Ciccarelli O, Enzinger C, et al. MAGNIMS consensus recommendations on the use of brain and spinal cord atrophy measures in clinical practice. *Nat Rev Neurol.* 2020; 16 (3): 171–82. DOI: 10.1038/s41582-020-0314-x.
 17. Vega-P JM, Pascual LA. High-pressure bladder: an underlying factor mediating renal damage in the absence of reflux? *BJU Int.* 2001; 87 (6): 581–4. DOI: 10.1046/j.1464-410x.2001.00082.x.
 18. Peyronnet B, Krupp LB, Reynolds WS, Gamé X, Amarenco G, Cornu JN, et al. Nocturia in Patients With Multiple Sclerosis. *Rev Urol.* 2019; 21 (2–3): 63–73.
 19. Andersson K-E, Madersbacher H, Altaweel W, Vasudeva P, Igawa Y. Drug Treatment. Handbook of Neurourology. Singapore, 2023; p. 281–315.
 20. Van Kerrebroeck P, Andersson KE. Terminology, epidemiology, etiology, and pathophysiology of nocturia. *Neurourol Urodyn.* 2014; 33 (Suppl.1): S2–5. DOI: 10.1002/nau.22595.
 21. Kowalik CG, Cohn JA, Delpé S, Reynolds WS, Kaufman MR, Milam DF, et al. Nocturia: Evaluation and Current Management Strategies. *Rev Urol.* 2018; 20 (1): 1–6. DOI: 10.3909/riu0797.
 22. Filippova ES, Bazhenov IV, Moskvina EY, Zyryanov AV, Borzunov IV. Perevod i aprobacija russkojazychnoj versii oprosnika SF-Qualiveen. *Urologicheskie vedomosti.* 2019; 9: 100. Russian.
 23. Kapica-Topczewska K, Tarasiuk J, Chorąży M, Czarnowska A, Broła W, Szczepański M, et al. The epidemiology of comorbidities among multiple sclerosis patients in northeastern Poland. *Mult Scler Relat Disord.* 2020; 41: 102051. DOI: 10.1016/j.msard.2020.102051.
 24. Harding K, Zhu F, Alotaibi M, Duggan T, Tremlett H, Kingwell E. Multiple cause of death analysis in multiple sclerosis: A population-based study. *Neurology.* 2020; 94 (8): e820–e829. DOI: 10.1212/WNL.0000000000008907.
 25. Medeiros Junior WLG, Demore CC, Mazaró LP, de Souza MFN, Parolin LF, Melo LH, et al. Urinary tract infection in patients with multiple sclerosis: An overview. *Mult Scler Relat Disord.* 2020; 46: 102462. DOI: 10.1016/j.msard.2020.102462.
 26. Grebenkina PV, Selkov SA, Kraeva LA, Sokolov DI. Vzaimodejstvie bakterij gruppy ESKAPE i NK-kletok: vzaimnaja regulacija i rol' v razvitii reproduktivnyh patologij. *Infekcija i immunitet.* 2023; 13 (4): 609–26. DOI: 10.15789/2220-7619-CBE-15452.
 27. Miller WR, Arias CA. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat Rev Microbiol.* 2024; 22 (10): 598–616. DOI: 10.1038/s41579-024-01054-w.
 28. Yarets Yul. Patogennyj potencial bakterij gruppy ESKAPE, vydelennyj iz ran: harakteristika feno- i genotipicheskijh markerov i vozmozhnost' ih prakticheskogo primenenija. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta.* 2022; 20 (4): 400–13. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-4-400-413. Russian.
 29. Phé V, Chartier-Kastler E, Panicker JN. Management of neurogenic bladder in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Urol.* 2016; 13 (5): 275–88. DOI: 10.1038/nrurol.2016.53.
 30. Panicker JN, Fowler CJ. Lower urinary tract dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol.* 2015; 130: 371–81. DOI: 10.1016/B978-0-444-63247-0.00021-3.

СИНЕРГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ НИЗКОИНТЕНСИВНОЙ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ УДАРНО-ВОЛНОВОЙ ТЕРАПИИ И ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ ПРИ ЭРЕКТИЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Й. Ч. Ли^{#1,2}, Т. Д. Янг^{#3,4}, У. Ч. Чен^{2,3,4}, Н. К. Дуби^{5,6}, Х. Чатурведи⁷, А. Ч. Хуанг^{8,9}, Ч. Х. Чанг^{3,4,10}, Ч. Ч. Лин^{3,4}, М. Ч. Лю^{2,3,4,11,12} ✉

- ¹ Отделение сестринского ухода, Больница Медицинского университета Тайбея, Тайбей, Тайвань
² Академический институт клинической медицины, Школа медицины, Медицинский колледж, Медицинский университет Тайбея, Тайбей, Тайвань
³ Отделение урологии, Больница Медицинского университета Тайбея, Тайбей, Тайвань
⁴ Научно-исследовательский центр урологии и нефрологии, Медицинский университет Тайбея, Тайбей, Тайвань
⁵ Victory Biotechnology Co., Ltd., Тайбей, Тайвань
⁶ Программа для руководителей по управлению здравоохранением, Индийский институт менеджмента Лакхнау, Лакхнау, Индия
⁷ Медицинский колледж Чандаули Бабы Кинарама, Уттар-Прадеш, Индия
⁸ Институт традиционной медицины, Школа медицины, Национальный университет Ян Мин Цзяо Дун, Тайбей, Тайвань
⁹ Хирургическое отделение, Городская больница Тайбея, филиал Рен-Ай, Тайбей, Тайвань
¹⁰ Институт микробиологии и иммунологии, Национальный университет Ян Мин Цзяо Дун, Синьчжу, Тайвань
¹¹ Научно-клинический центр, Больница Медицинского университета Тайбея, Тайбей, Тайвань
¹² Стоматологический колледж, Медицинский университет Тайбея, Тайбей, Тайвань

Эректильная дисфункция (ЭД) — патологическое состояние репродуктивной системы, при котором нарушается способность достижения или поддержания эрекции. Оно губительно сказывается на взаимоотношениях, уверенности в себе и эффективности. Метод лечения ЭД — низкоинтенсивная ударно-волновая терапия (низкоинтенсивная УВТ). Однако ее применение связано с нежелательными явлениями, такими как синяки, покраснения и боль. В ходе настоящего исследования применяли обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) — полученный из крови биоматериал, содержащий большое количество факторов роста, для повышения терапевтической эффективности низкоинтенсивной УВТ при ЭД. Оценивали синергический эффект PRP и низкоинтенсивной УВТ, при этом низкоинтенсивную УВТ применяли экстракорпорально одновременно с PRP. Оценку клинических показателей проводили через 22 ± 2, 50 ± 2 и 78 ± 2 дней. Статистический анализ выполняли с помощью непараметрического критерия Фридмана для повторных измерений (альтернатива дисперсионному анализу (ANOVA)). Фиксировали показатели Международного индекса эректильной функции (МИЭФ-5) и показатели твердости полового члена при эрекции (EHS). Показатель по шкале МИЭФ-5 до лечения составил 8,36 ± 1,44 баллов. Через 22 ± 2 дня комбинированного лечения с применением PRP и низкоинтенсивной УВТ показатель составил 14,45 ± 2,12 баллов ($p < 0,028$), а в дальнейшем увеличился до 15,45 ± 1,93 ($p < 0,008$) и 16,18 ± 1,48 ($p < 0,001$) баллов — через 50 ± 2 и 78 ± 2 дней лечения соответственно. Средний показатель по шкале EHS до лечения составил 1,64 ± 0,20 ($p < 0,002$). Он увеличился до 2,81 ± 0,26 ($p < 0,002$), 3,09 ± 0,25 ($p < 0,0002$) и 3,18 ± 0,12 ($p < 0,000$) через 22 ± 2, 50 ± 2 и 78 ± 2 дней соответственно. Комбинированное лечение с применением PRP и низкоинтенсивной УВТ продемонстрировало мощный синергический эффект, улучшив показатели МИЭФ-5 и EHS. Однако для достижения консенсуса необходимы широкомасштабные клинические исследования механизмов этого явления.

Ключевые слова: эректильная дисфункция, низкоинтенсивная УВТ, обогащенная тромбоцитами плазма (PRP), МИЭФ-5, EHS

Благодарности: авторы благодарят TCM Biotech International Corp. (Новый Тайбэй, Тайвань) за предоставленную установку VertePLT Plus Platelet Concentrate Separator (VertePLT) для приготовления PRP для последующего применения в терапевтических целях у пациентов с ЭД.

Вклад авторов: Й. Ч. Ли, Т. Д. Янг — идея исследования, методология, анализ данных, проверка, валидация, написание рукописи (равнозначный вклад авторов); У. Ч. Чен, Н. К. Дуби, Х. Чатурведи, А. Ч. Хуанг, Ч. Х. Чанг, Ч. Ч. Лин — анализ данных, проверка, валидация; М. Ч. Лю — анализ данных, проверка, валидация, написание литературного обзора, редактирование, общее руководство.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено объединенным институциональным наблюдательным советом Медицинского университета Тайбея (IRB № N201907013) и Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств Тайваня (TFDA: дело № 1086614281), зарегистрировано на ClinicalTrials.gov (дата обращения 04 июня 2020 г.) (NCT04416802). Информированное согласие подписали все участники.

✉ **Для корреспонденции:** Минг-Че Лю
Тайбей, Тайвань, 11031; d204097002@tmu.edu.tw

Статья получена: 21.09.2024 **Статья принята к печати:** 20.11.2024 **Опубликована онлайн:** 05.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.054

SYNERGISTIC EFFICACY OF LOW-INTENSITY EXTRACORPOREAL SHOCK WAVE AND PLATELET-RICH PLASMA ON ERECTILE DYSFUNCTION

Lee YC^{#1,2}, Yang TD^{#3,4}, Chen WC^{2,3,4}, Dube NK^{5,6}, Chaturvedi H⁷, Huang AC^{8,9}, Chang CH^{3,4,10}, Lin CC^{3,4}, Liu MC^{2,3,4,11,12} ✉

- ¹ Nursing Department, Taipei Medical University Hospital, Taipei, Taiwan
² Graduate Institute of Clinical Medicine, School of Medicine, College of Medicine, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan
³ Department of Urology, Taipei Medical University Hospital, Taipei, Taiwan
⁴ TMU Research Center of Urology and Kidney, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan
⁵ Victory Biotechnology Co., Ltd., Taipei, Taiwan
⁶ Executive Programme in Healthcare Management, Indian Institute of Management Lucknow, Lucknow, India
⁷ Baba Kinaram Autonomous State Medical College Chandauli, Uttar Pradesh, India
⁸ Institute of Traditional Medicine, School of Medicine, National Yang-Ming Chiao Tung University, Taipei, Taiwan
⁹ Department of Urology, Department of Surgery, Taipei City Hospital Ren-Ai Branch, Taipei, Taiwan
¹⁰ Institute of Microbiology and Immunology, National Yang Ming Chiao Tung University, Hsinchu, Taiwan
¹¹ Clinical Research Center, Taipei Medical University Hospital, Taipei, Taiwan
¹² School of Dental Technology, College of Oral Medicine, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

Erectile dysfunction (ED), an unusual sexual condition in which the person fails to attain or sustain an erect penis, severely impacts personal relationships, confidence, and efficiency. To date, low-intensity extracorporeal shock wave therapy (Li-ESWT) is an option to manage ED; however, it is associated with adverse events such as bruising, redness, and pain. Hence, in this study, we applied platelet-rich plasma (PRP), a blood-derived biomaterial containing cargo of growth factors, to enhance the therapeutic efficacy of Li-ESWT on ED. We assessed the synergistic effect of PRP+Li-ESWT, in which Li-ESWT was extracorporeally applied simultaneously with PRP. They were evaluated clinically at 22 ± 2, 50 ± 2 and 78 ± 2 days. Statistical analysis was performed using a non-parametric test, Friedman repeated measures as an alternative non-parametric test of ANOVA test. The international index of erectile function (IIEF-5) and erection hardness score (EHS) were recorded. IIEF-5 score in the pre-treated group was 8.36 ± 1.44. After 22 ± 2 days of synergistic PRP+Li-ESWT treatment, the score was 14.45 ± 2.12 ($p < 0.028$). This score further increased to 15.45 ± 1.93 ($p < 0.008$) and 16.18 ± 1.48 ($p < 0.001$) after 50 ± 2 days and 78 ± 2 days of treatment, respectively. The mean pre-treated EHS was 1.64 ± 0.20 ($p < 0.002$), which increased to 2.81 ± 0.26 ($p < 0.002$), 3.09 ± 0.25 ($p < 0.0002$) and 3.18 ± 0.12 ($p < 0.000$) on day 22 ± 2, 50 ± 2 and 78 ± 2 days, respectively. Conclusively, our study demonstrated potent synergistic therapy of PRP+Li-ESWT in ED treatment by improving IIEF-5 and EHS scores. However, extensive mechanism-based clinical studies are needed to reach a consensus.

Keywords: erectile dysfunction, Li-ESWT, platelet-rich plasma (PRP), IIEF-5, EHS

Acknowledgements: we are grateful to TCM Biotech International Corp., New Taipei City, Taiwan to provide VertePLT Plus Platelet Concentrate Separator (VertePLT) to prepare PRP for therapeutic application in ED patients.

Author contribution: Lee YC, Yang TD — Idea of the study, methodology, data analysis, investigation, validation, Writing-original draft (equal first authors); Chen WC, Dube NK, Chaturvedi H, Huang AC, Chang CH, Lin CC — data analysis, investigation, validation; Liu MC — data analysis, investigation, validation, Writing-Review and Editing, Supervision.

Compliance with ethical standards: this study was approved by Taipei Medical University-Joint Institutional Review Board (IRB No. N201907013) and Taiwan FDA (TFDA: Case No. 1086614281) and registered at ClinicalTrials.gov (accessed on 04 June 2020) (NCT04416802). A written informed consent was obtained from the subjects enrolled.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ming-Che Liu
Taipei, Taiwan 11031; d204097002@tmu.edu.tw

Received: 21.09.2024 **Accepted:** 20.11.2024 **Published online:** 05.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.054

Эректильная дисфункция (ЭД) — это патологическое состояние репродуктивной системы, при котором нарушается способность достижения или поддержания эрекции [1]. Оно может серьезно влиять на сексуальное здоровье и половую активность, оказывая отрицательное воздействие на межличностные взаимоотношения, психологическое состояние и качество жизни [1, 2]. Эрекцию регулирует парциальное давление кислорода. Его снижение приводит к уменьшению трабекулярного гладкомышечного компонента пещеристого тела, в результате чего возникают венозная утечка, окислительный стресс, воспаление, структурные изменения интерстиция полового члена и нейронных структур, причинами которых являются вазоконстрикция, эндотелиальная дисфункция, веноокклюзионная болезнь. В долгосрочной перспективе они могут привести к возникновению и прогрессированию ЭД [3].

Согласно прогнозам, к 2025 г. заболеваемость населения ЭД может достичь 322 млн случаев [1, 4]. Данные недавнего проспективного эпидемиологического исследования позволяют предположить, что распространенность ЭД может варьировать между 32% и 80%, в зависимости от возраста [5]. С возрастом риск и заболеваемость ЭД также увеличиваются, особенно в возрастной группе 40–70 лет [5]. На сегодняшний день, несмотря на применение различных традиционных методов лечения ЭД, включая медикаментозные и хирургические методы, результаты показывают недостаточную эффективность либо имеют место нежелательные явления. По этой причине срочно необходимо комплексное терапевтическое решение.

Низкоинтенсивная ударно-волновая терапия (низкоинтенсивная УВТ) представляет собой метод лечения, обладающий потенциалом с точки зрения регенерации эндотелия, клеток гладкой мускулатуры, а также нервных волокон, в которых вырабатывается нейронная NO-синтаза [6]. Ударные волны представляют собой звуковые волны с частотой 16–20 МГц и периодом до 10 мкс, направленные на участок, который может представлять собой ткань или орган-мишень для терапии [7]. Низкоинтенсивные ударные волны — это низкоэнергетические волны с плотностью потока энергии ниже 0,1 мДж/мм², однако нет единого мнения о диапазоне плотности потока энергии [8]. Изменения включают в себя пролиферацию Т-лимфоцитов, вовлечение стволовых клеток, увеличение количества связей на поверхности эндотелия капилляров, регенерацию нервных клеток и аксонов, изменения коллагенового матрикса, а также уменьшение воспаления и окислительного стресса [9].

Обогащенная тромбоцитами плазма (PRP) представляет собой продукт крови, богатый факторами роста, такими как

фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), тромбоцитарные факторы роста (PDGF), гепатоцитарный фактор роста (HGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), эпидермальный фактор роста (EGF) и различные цитокины. Эти факторы задействованы в процессах роста и заживления тканей через активацию пролиферации фибробластов, гладкомышечных клеток и нейтрофилов, а также дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток [1, 10]. PRP содержит также биомолекулы, такие как аденозинтрифосфат, аденозиндифосфат, дофамин, серотонин, гистамин, и ионы Ca^{+2} , которые играют ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза [11]. Во время применения описанных выше терапевтических мер изучают потенциал PRP в отношении лечения ЭД. Однако показано, что терапевтическую эффективность PRP можно повысить путем комбинирования с другими, альтернативными методами лечения, такими как низкоинтенсивная ударно-волновая терапия (низкоинтенсивная УВТ). Более того, доклинические и клинические исследования ограничивают их широкое применение для лечения ЭД. По этой причине мы исследовали синергический эффект PRP и лечения с применением низкоинтенсивной УВТ при ЭД.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

С 20 мая 2020 г. по 22 февраля 2022 г. 11 пациентов с ЭД проходили комбинированное лечение с применением низкоинтенсивной УВТ и PRP в течение 78 ± 2 дней. Всех пациентов подробно проинформировали о комбинированном лечении с применением низкоинтенсивной УВТ и PRP, как показано на схеме дизайна исследования (рис. 1).

Выполнена оценка демографических данных пациентов, таких как возраст, материальное положение, длительность ЭД, среднее значение индекса массы тела (ИМТ), а также уровни триглицеридов, липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), простатического специфического антигена (ПСА) и тестостерона. Помимо этого зафиксированы факты наличия артериальной гипертензии, сахарного диабета, доброкачественной гиперплазии предстательной железы, дислипидемии, а также применения антиагрегантных средств.

Критерии включения и критерии исключения

В исследование были включены пациенты, страдавшие импотенцией более 3 месяцев, с показателями

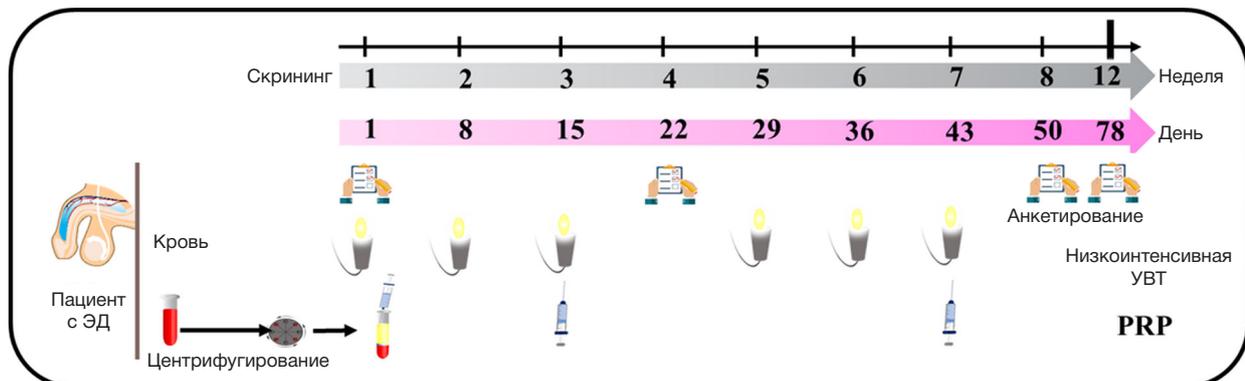


Рис. 1. Схема проведения эксперимента. ЭД — эректильная дисфункция. УВТ — ударно-волновая терапия. PRP — обогащенная тромбоцитами плазма

Международного индекса эректильной функции (МИЭФ-5) меньше или равными 21, показателями жесткости полового члена при эрекции (EHS) 0, ≤ 3, в возрасте старше 30 лет. При этом пациентов исключали при наличии у них гипогонадизма, склонности к кровотечениям, при невозможности лечения, при наличии СПИДа, сифилиса, кондилом, радикальной простатэктомии в анамнезе, рака простаты или злокачественных опухолей малого таза, дисфункции половых желез, деформации полового члена, протеза полового члена, психических заболеваний, заболеваний нервной системы (множественной миеломы, атрофии головного мозга и т. д.), кардиостимулятора. Пациентов также исключали в случаях несоответствия критериям настоящего исследования по результатам обследования, злоупотребления алкоголем или наркотиками.

Применение низкоинтенсивной УВТ

Низкоинтенсивную УВТ с использованием аппарата PiezoWave 2 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen; Германия) проводили на 1-й, 8-й, 15-й, 29-й, 36-й и 43-й день. Во время каждого сеанса лечения применяли 2000 ударных импульсов (УИ) (0,16 мДж/мм², 6–8 герц (Гц)) на стволе полового члена и 2000 УИ на пещеристом теле в промежности.

Получение и введение человеческой обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP)

Для получения PRP мы использовали специализированный сепаратор компонентов крови, содержащий ACD-A в качестве антикоагулянта и специфический гель-сепаратор для отделения тромбоцитов от плазмы и предупреждения образования примесей других компонентов крови, в том числе эритроцитов и лейкоцитов. В стерильных условиях 7 мл аутологичной периферической крови человека забирали в сепаратор PLTenus PLUS Platelet Concentrate Separator (TCM Biotech International Corp., Тайбей, Тайвань) посредством венопункции. Затем кровь центрифугировали при 500~1200 G в течение 8 мин. После этого около 4 мл плазмы с тромбоцитами, сохранившимися над слоем тиксотропного геля, отбирали в пластиковую пробирку для терапевтического применения. Затем по 0,5 мл PRP вводили интракавернозно в шесть участков

ствола полового члена. Терапевтическую эффективность оценивали по показателям МИЭФ-5 и EHS.

Оценка исходов

Исход лечения оценивали, основываясь на показателях по шкалам МИЭФ-5 и EHS. МИЭФ-5 представляет собой анкету для оценки эректильной функции и тяжести ЭД [12]. Она содержит пять блоков для оценки эректильной функции, сексуального желания, оргазмической функции, удовлетворения от полового акта и общего удовлетворения. Жесткость полового члена при эрекции оценивали по шкале EHS — 4-балльной шкале самооценки из одного блока [13]. Эта надежная шкала демонстрирует также прямую связь между твердостью полового члена при эрекции и половым актом. Показатели, полученные до начала лечения, сравнивали с показателями после лечения, чтобы оценить эффективность комбинированного лечения. Показатели после лечения были получены через 22 ± 2, 50 ± 2 и 78 ± 2 дней.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью непараметрического критерия Фридмана для повторных измерений, представляющего собой альтернативу дисперсионному анализу (ANOVA), подходящую для данных, распределение которых отличается от нормального, и небольших выборок. Помимо этого в качестве апостериорного анализа было выполнено попарное сравнение с применением критерия Дарбина-Коновара (альтернатива *t*-критерию Стьюдента). Результаты считали значимыми, только когда они не превышали 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Демографические данные пациентов

В исследовании приняли участие 11 пациентов, которым провели низкоинтенсивную УВТ в комбинации с PRP. Как показано в табл. 1, между пациентами не было значимых различий по возрасту, ИМТ, уровням ЛПВП, ПСА и тестостерона. При этом имели место значимые различия по длительности ЭД. Из 11 пациентов восемь (72,73%) были женаты, а пятеро (45,46%) страдали артериальной

Таблица 1. Демографические данные пациентов. ЭД — эректильная дисфункция, ИМТ — индекс массы тела, СД — сахарный диабет, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, ТГ — триглицериды, ДГПЖ — доброкачественная гиперплазия предстательной железы, ПСА — простатический специфический антиген

Переменная	N	Значение	<i>p</i> (критерий Шапиро-Уилка)
Возраст (лет)	11	60,3 ± 10,4	0,154
Длительность ЭД (лет)	11	2 [1–8]	0,001
Средний ИМТ (кг/м ²)	11	25,2 ± 3,06	0,391
ТГ (мг/дл)	9	187 ± 119	0,198
ЛПВП (мг/дл)	8	47,3 ± 10,8	0,524
ПСА	10	1,10 [0,925–2,60]	0,005
Уровень тестостерона	11	5,02 ± 1,55	0,322
Семейное положение (д/н)	11	8 д / 3 н	
Артериальная гипертензия (д/н)	11	5 д / 6 н	
СД	11	5 д / 6 н	
Дислипидемия	11	4 д / 7 н	
Прием антиагрегантов	11	3 д / 8 н	
ДГПЖ	11	10 д / 1 н	

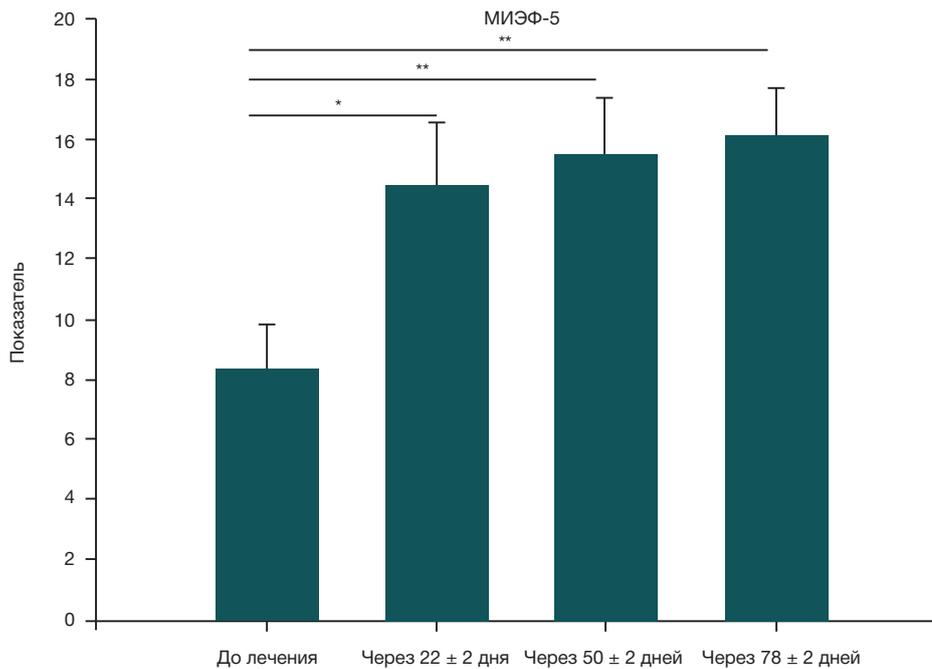


Рис. 2. Показатели по шкале МИЭФ-5 до лечения и через 22 ± 2, 50 ± 2 и 78 ± 2 дней после лечения. МИЭФ-5 — Международный индекс эректильной функции-5. * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$

гипертензией и сахарным диабетом. Три пациента (27,27%) принимали антиагреганты. После лечения была выполнена оценка показателей МИЭФ-5 и EHS.

Влияние PRP и низкоинтенсивной УВТ на показатели по шкале МИЭФ-5

Медианные [q1–q3] и средние (\pm стандартное отклонение) показатели по шкале МИЭФ-5 (рис. 2) для двух групп, полученные в разное время (до начала лечения и после лечения PRP в комбинации с низкоинтенсивной УВТ), представлены в табл. 2. В группе, получавшей PRP в комбинации с низкоинтенсивной УВТ, медианные [q1–q3] показатели по шкале МИЭФ-5 значимо выросли на временных отрезках t1–t2, t1–t3 и t1–t4 ($p < 0,001$).

Влияние PRP и низкоинтенсивной УВТ на жесткость полового члена при эрекции

Показатели твердости полового члена при эрекции (EHS) (рис. 3) демонстрировали схожую тенденцию: медианные [q1–q3] показатели значимо выросли на временных отрезках t1–t2, t1–t3 и t1–t4 ($p < 0,001$), продемонстрировав эффективность применения PRP в комбинации с низкоинтенсивной УВТ в отношении увеличения твердости

полового члена при эрекции, составляющей основной компонент эректильной функции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Низкоинтенсивную УВТ считают более безопасным методом лечения ЭД, особенно в случаях легкой васкулогенной ЭД или сниженной восприимчивости к лечению ингибиторами PDE-5 [6]. Она способствует неангиогенезу, улучшает кровоснабжение пещеристых тел, уменьшает воспаление и стресс [14]. У пациентов, страдающих сахарным диабетом, низкоинтенсивная УВТ имитирует механическое раздражение, влияет на проницаемость мембран и регулирует сигнальные каскады, что приводит к подавлению воспалительного ответа, выделению оксида азота, мобилизации эндотелиальных и стволовых клеток и улучшению состояния нервных волокон, в которых вырабатывается нейронная NO-синтаза, в пещеристых телах и состоянии эндотелия артерий и синусов пещеристых тел [15]. Основываясь на этих данных, можно ожидать усиления всех терапевтических эффектов, прежде всего неоваскуляризации, при добавлении PRP.

PRP содержит большое количество трофических факторов роста и обладающих регенеративными свойствами молекул, которые могут способствовать

Таблица 2. Показатели МИЭФ-5 и EHS до и после лечения

Временная шкала / Переменная	t1 медиана [q1–q3]; среднее \pm SD	t2 медиана [q1–q3]; медиана \pm SD	t3 медиана [q1–q3]; медиана \pm SD	t4 медиана [q1–q3]; медиана \pm SD	Q (p)	Значимость по результатам апостериорного анализа (p)
МИЭФ-5	7 [5–10,5]; 8,36 \pm 4,80	13 [10–20,5]; 14,5 \pm 7,05	15 [13–20,5]; 15,5 \pm 6,42	17 [13–19,5]; 16,2 \pm 4,92	22,5 < 0,001	t1–t2 (<0,001), t2–t3 (<0,001), t1–t4 (<0,001), t2–t4 (0,011)
EHS	2 [1–2]; 1,64 \pm 0,674	3 [2,5–3]; 2,82 \pm 0,874	3 [3–3,5]; 3,09 \pm 0,831	3 [3–3]; 3,18 \pm 0,405	22,2 (0,001)	t1–t2 (<0,001), t2–t3 (<0,001), t1–t4 (<0,001), t2–t4 (0,043)

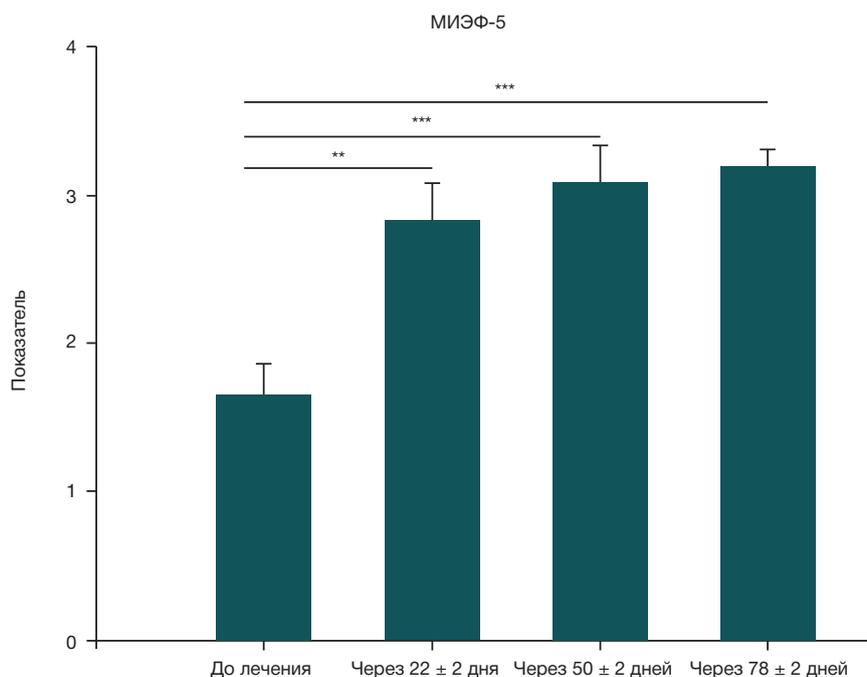


Рис. 3. Показатели по шкале EHS до лечения и через 22 ± 2, 50 ± 2 и 78 ± 2 дней после лечения. EHS — Шкала твердости полового члена при эрекции

вовлечению стволовых клеток, ангиогенезу, синтезу оксида азота и регенерации нервных волокон пещеристых тел. В мышинной модели PRP продемонстрировала нейропротекторное и нейрорегенеративное действие, в основе которого лежит снижение экспрессии каспазы-3 и TGF-β1, приводящее к снижению уровня PDGF [16]. Содержащиеся в PRP VEGF и BDNF способствуют регенерации нервных волокон, повышению выработки нейрональной NO-синтазы и росту аксонов [17]. Низкоинтенсивная УВТ также индуцирует экспрессию VEGF и его рецептора Flt-1 (рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1) [18], которая может быть усилена с помощью содержащегося в PRP VEGF. Помимо этого BDNF активирует путь JAK-STAT (преобразователи сигналов янускиназы и активаторы транскрипции), способствующий росту нейритов в области тазовых нервных узлов [17, 19]. Содержащиеся в PRP BDNF, IGF-1, VEGF и bFGF эффективно восстанавливали гемодинамику полового члена у модельных животных в ходе доклинических исследований [20].

В нашем исследовании у ряда пациентов имели место артериальная гипертензия, диабет и высокий уровень триглицеридов (табл. 1). Установлено, что 25% и 60% пациентов, проходивших лечение по поводу артериальной гипертензии и диабета, страдали ЭД [21]. С возрастом снижается уровень тестостерона, уменьшается количество гладкомышечных клеток полового члена и эластичных волокон белочной оболочки пещеристых тел, что приводит к ЭД [22]. Эндотелиальная дисфункция вследствие дислипидемии является значимой причиной ЭД [23]. Помимо этого установлена связь между ЭД и как минимум одним сопутствующим заболеванием, таким как депрессия (11,1%), сахарный диабет (20,2%), гиперлипидемия (42,4%) и артериальная гипертензия (41,6%). Таким образом, наличие у наших пациентов перечисленных выше признаков/демографических особенностей связано с ЭД.

Исследование предполагало применение низкоинтенсивной УВТ в комбинации с лечением PRP для оценки синергического эффекта комбинированного лечения. Исходы лечения, а именно эректильную функцию и твердость полового члена при эрекции, оценивали

по показателям MIЭФ-5 и EHS (табл. 2). Медиана изменения показателя по шкале MIЭФ-5 при применении низкоинтенсивной УВТ у пациентов с ЭД составила +3,5 ($p = 0,0049$) и +1 ($p = 0,046$) через месяц и год после лечения [24]. Применение низкоинтенсивной УВТ обеспечивало увеличение исходного показателя по шкале MIЭФ-5 с $8,27 \pm 2,741$ до $10,43 \pm 8,43$ после месяца лечения, при этом терапевтический эффект сохранялся на том же уровне в течение 6 месяцев [25]. Другое рандомизированное клиническое исследование показало, что еженедельное применение низкоинтенсивной УВТ в течение пяти недель улучшало показатели EHS и MIЭФ-5. Показатель по шкале EHS увеличился на 0,35 и 0,50 балла, а показатель MIЭФ-5 — на 2,40 и 3,45 баллов после 4 и 12 недель лечения [26]. Применение низкоинтенсивной УВТ в течение 14 недель (раз в неделю) с перерывом на 4 недели после 5 недель лечения улучшало показатели по шкале MIЭФ-ЭФ от исходного значения 11,5 баллов до 13 и 12,6 баллов после 5 и 10 сеансов соответственно [27]. Описанные выше исследования продемонстрировали улучшение показателей MIЭФ-5 и EHS в диапазоне между 2–5 и 0,3–2 баллами соответственно. Однако в ходе нашего исследования был зафиксирован прирост на 6–8 баллов по сравнению с исходным показателем по шкале MIЭФ-5 ($8,36 \pm 1,44$), который значимо увеличился до $14,45 \pm 2,12$, $15,45 \pm 1,93$ и $16,18 \pm 1,48$ баллов через 22 ± 2, 50 ± 2 и 78 ± 2 дней лечения соответственно. Аналогичным образом исходный показатель по шкале EHS ($1,64 \pm 0,20$) увеличился до $2,81 \pm 0,26$, $3,09 \pm 0,25$ и $3,18 \pm 0,12$ баллов через 22 ± 2, 50 ± 2 и 78 ± 2 дней лечения соответственно. Эти данные свидетельствуют об улучшении эректильной функции при применении низкоинтенсивной УВТ в комбинации с PRP, что представляет собой лучший результат по сравнению с ранее описанным применением низкоинтенсивной УВТ в качестве монотерапии.

Усиление терапевтического воздействия может быть обусловлено применением PRP, способствующей естественному выздоровлению. При их применении для лечения ЭД показатели по шкале MIЭФ улучшаются без каких-либо нежелательных явлений [28]. Проспективное

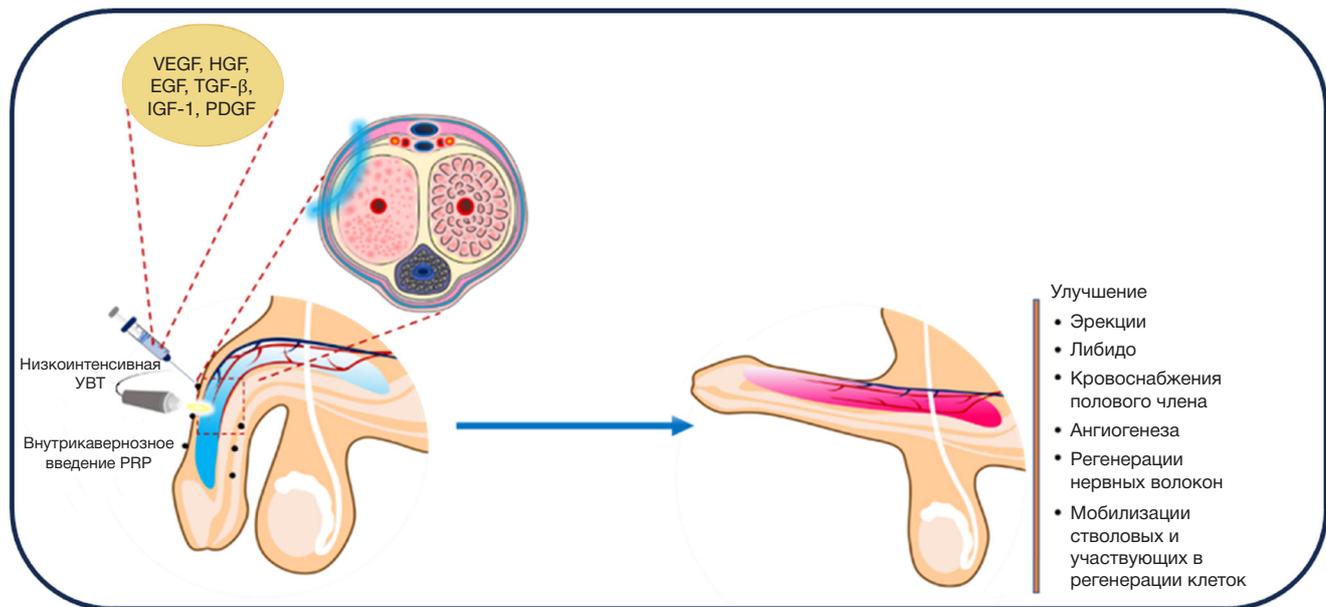


Рис. 4. Возможные исходы лечения с применением PRP и низкоинтенсивной УВТ. Итракавернозное введение PRP в 6 участков одновременно с применением низкоинтенсивной УВТ. PRP вводили в ствол полового члена — от венечной борозды до мошоночно-стволового соединения; черными точками обозначены места инъекций. PRP — обогащенная тромбоцитами плазма. УВТ — ударно-волновая терапия

исследование продемонстрировало значительную эффективность PRP в отношении увеличения показателей по шкале МИЭФ после лечения ($p = 0,02$) [1]. Однако на вентральной стороне в центральной части ствола полового члена возникает фибротическая бляшка. При этом время интравагинальной задержки семяизвержения значительно улучшилось благодаря комбинированному лечению. Эффективность регенеративной терапии PRP при различных заболеваниях хорошо изучена, она связана с присутствием в PRP факторов роста и других биоактивных молекул. VEGF, представляющий собой компонент PRP, продемонстрировал способность эффективно восстанавливать эректильную функцию в животных моделях повреждения ЧН [29]. Кроме того, двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое клиническое исследование показало, что благодаря PRP после 6 месяцев лечения была достигнута минимальная клинически значимая разница (MCID) в показателях по шкале МИЭФ-ЭФ (блок об эрекции) [30]. Кроме того, произошел очевидный рост удовлетворения по поводу отсутствия каких-либо нежелательных явлений геморрагического характера.

Показано, что PRP улучшает эректильную функцию в крысиной модели диабета за счет ингибирования атрофии гладкомышечных клеток пещеристого тела, защиты пещеристого тела и регенерации волокон ЧН [16]. Кроме того, PRP восстанавливает ткани, улучшает все параметры эректильной функции и обеспечивает регенерацию миелинизированных нервных волокон у крыс с сахарным диабетом [16]. Таким образом, PRP может эффективно минимизировать связанные с сахарным диабетом послеоперационные осложнения при лечении ЭД. Помимо этого лечение PRP значительно улучшает интракавернозное давление, среднее артериальное давление, уровни IGF-1, BDNF и VEGF у крыс с ЭД, ассоциированной с гиперлипидемией [31]. Лечение PRP также улучшает состояние клеток эндотелия, выработку нейронной NO-синтазы и эндотелиальной NO-синтазы клетками пещеристого тела, что приводит к снижению окислительного стресса и индекса апоптоза. Основываясь на полученных результатах, мы сделали

вывод, что PRP может улучшить состояние пациентов с ЭД, проходящих лечение с применением низкоинтенсивной УВТ, благодаря ее ранозаживляющему потенциалу в отношении микротравм, полученных во время применения низкоинтенсивной УВТ (рис. 4).

Ограничения исследования

Помимо положительных результатов лечения наше исследование имело ряд ограничений, таких как отсутствие контрольной группы, получающей низкоинтенсивную УВТ, которая будет исследована в будущем. Однако проведенное ранее исследование применения низкоинтенсивной УВТ в качестве монотерапии [32] продемонстрировало эффективность и безопасность как у пациентов с ЭД, страдающих диабетом, так и у пациентов без диабета. Таким образом, ожидается, что применение низкоинтенсивной УВТ в комбинации с PRP обеспечит более высокую терапевтическую эффективность при ЭД. Оценку боли, связанной с инъекциями PRP, также не проводили — это тоже станет предметом наших дальнейших исследований. Еще одним ограничением исследования является малый размер выборок. Однако мы выполнили статистический анализ с применением непараметрического критерия Фридмана для повторных измерений, представляющего собой альтернативу дисперсионному анализу (ANOVA), подходящую для данных, распределение которых отличается от нормального, и небольших выборок. Затем в качестве апостериорного анализа было выполнено попарное сравнение с применением критерия Дарбина-Коновара (альтернатива t -критерию Стьюдента). Тем не менее, рекомендуется повторить исследование на большей выборке. Возраст тоже является значимым фактором поддержания здоровой сексуальной активности. Согласно эпидемиологическим данным, распространенность умеренной эректильной дисфункции (ЭД) и полной импотенции увеличивается с возрастом; показано, что распространенность ЭД составляет 5,1%, 14,8% и 44% у мужчин в возрасте 29–30, 40–59 и 60–69 лет соответственно [33]. Кроме того, ЭД диагностирована

у 50% мужчин в возрасте старше 70 лет. По этой причине мы не указали максимальный возраст, однако в нашей выборке максимальный возраст составил 70–71 год, как и в более ранних исследованиях.

ВЫВОДЫ

Исследование продемонстрировало синергический потенциал PRP и низкоинтенсивной УВТ при применении

для лечения ЭД, выраженный в увеличении показателей МИЭФ-5 и EHS. Однако усиливающий эффект PRP при применении вместе с низкоинтенсивной УВТ следует подтвердить в ходе широкомасштабных многоцентровых клинических исследований. Кроме того, ввиду отсутствия утвержденных протоколов необходимы дополнительные усилия для разработки эффективной процедуры регенеративного лечения для достижения наилучших клинических результатов.

Литература

1. Taş T, Çakıroğlu B, Arda E, Onuk Ö, Nuhoğlu B. Early Clinical Results of the Tolerability, Safety, and Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma Administration in Erectile Dysfunction. *Sex Med.* 2021; 9: 100313.
2. Vance G, Zeigler-Hill V, Shackelford TK. Erectile Dysfunction and Sexual Coercion: The Role of Sperm Competition Risk. *Archives of Sexual Behavior.* 2022; 51 (6): 2781–90.
3. Trebatický B, Žitňanová I, Dvořáková M, Országhová Z, Paduchová Z, Ďuračková Z, et al. Role of oxidative stress, adiponectin and endoglin in the pathophysiology of erectile dysfunction in diabetic and non-diabetic men. *Physiol Res.* 2019; 68: 623–31.
4. Ayta I, McKinlay J, Krane R. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU international.* 1999; 84: 50–56.
5. Colson MH, Cuzin B, Faix A, Grellet L, Huyghes E. Current epidemiology of erectile dysfunction, an update. *Sexologies.* 2018; 27: e7–e13.
6. Geyik S. Comparison of the efficacy of low-intensity shock wave therapy and its combination with platelet-rich plasma in patients with erectile dysfunction. *Andrologia.* 2021; 53: e14197.
7. Lei H, Liu J, Li H, Wang L, Xu Y, Tian W, et al. Low-Intensity Shock Wave Therapy and Its Application to Erectile Dysfunction. *wjmh.* 2013; 31: 208–14.
8. Liu J, Zhou F, Li G-Y, Wang L, Li H-X, Bai G-Y, et al. Evaluation of the Effect of Different Doses of Low Energy Shock Wave Therapy on the Erectile Function of Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013; 14: 10661–73.
9. Sun D, Junger WG, Yuan C, Zhang W, Bao Y, Qin D, et al. Shockwaves Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Through ATP Release and Activation of P2X7 Receptors. *Stem Cells.* 2013; 31: 1170–80.
10. Mijiritsky E, Assaf HD, Peleg O, Shacham M, Ceroni L, Mangani L. Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review. *Biology.* 2021; 10: 317.
11. Bos-Mikich A, de Oliveira R, Frantz N. Platelet-rich plasma therapy and reproductive medicine. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2018; 35: 753–6.
12. Mark KP, Arenella K, Girard A, Herbenick D, Fu J, Coleman E. Erectile dysfunction prevalence in the United States: report from the 2021 National Survey of Sexual Wellbeing. *J Sex Med.* 2024; 21: 296–303.
13. Mulhall JP, Goldstein I, Bushmakin AG, Cappelleri JC, Hvidsten K. Validation of the Erection Hardness Score. *The Journal of Sexual Medicine.* 2007; 4: 1626–34.
14. Sokolakis I, Dimitriadis F, Teo P, Hatzichristodoulou G, Hatzichristou D, Giuliano F. The Basic Science Behind Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy for Erectile Dysfunction: A Systematic Scoping Review of Pre-Clinical Studies. *J Sex Med.* 2019; 16: 168–94.
15. Spivak L, Shultz T, Appel B, Verze P, Yagudaev D, Vinarov A. Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy for Erectile Dysfunction in Diabetic Patients. *Sex Med Rev.* 2021; 9: 619–27.
16. Liao C-H, Lee K-H, Chung S-D, Chen K-C, Praveen Rajneesh C, Chen B-H, et al. Intracavernous Injection of Platelet-Rich Plasma Therapy Enhances Erectile Function and Decreases the Mortality Rate in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International journal of molecular sciences.* 2022; 23: 3017.
17. Ding X-G, Li S-W, Zheng X-M, Hu L-Q, Hu W-L, Luo Y. The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian journal of andrology.* 2009; 11: 215–21.
18. Vardi Y, Appel B, Jacob G, Massarwi O, Gruenwald I. Can low-intensity extracorporeal shockwave therapy improve erectile function? A 6-month follow-up pilot study in patients with organic erectile dysfunction. *Eur Urol.* 2010; 58: 243–8.
19. Bella AJ, Lin G, Tantiwongse K, Garcia M, Lin CS, Brant W, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) acts primarily via the JAK/STAT pathway to promote neurite growth in the major pelvic ganglion of the rat: Part I. *The journal of sexual medicine.* 2006; 3: 815–20.
20. Huang Y-C, Wu C-T, Chen M-F, Kuo Y-H, Li J-M, Shi C-S. Intracavernous Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma Ameliorates Hyperlipidemia-Associated Erectile Dysfunction in a Rat Model. *Sexual Medicine.* 2021; 9: 100317.
21. Hafez ES, Hafez SD. Erectile dysfunction: anatomical parameters, etiology, diagnosis, and therapy. *Arch Androl.* 2005; 51: 15–31.
22. Seftel AD. Erectile dysfunction in the elderly: epidemiology, etiology and approaches to treatment. *J Urol.* 2003; 169: 1999–2007.
23. Miner M, Billups KL. Erectile Dysfunction and Dyslipidemia: Relevance and Role of Phosphodiesterase Type-5 Inhibitors and Statins. *The Journal of Sexual Medicine.* 2008; 5: 1066–78.
24. Frey A, Sønksen J, Fode M. Low-intensity extracorporeal shockwave therapy in the treatment of postprostatectomy erectile dysfunction: a pilot study. *Scand J Urol.* 2016; 50: 123–7.
25. Akande TO, Akinwunmi OM, Adebayo SA, Akinyinka AO, Shittu OB. Efficacy and safety of low-intensity extracorporeal shockwave therapy for treatment of vascular erectile dysfunction in nigerian men: Report of a study in Ibadan, South-West Nigeria. *Ann Ib Postgrad Med.* 2021; 19: 8–14.
26. Ladegaard PBJ, Mortensen J, Skov-Jepesen SM, Lund L. Erectile Dysfunction A Prospective Randomized Placebo-Controlled Study Evaluating the Effect of Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy (LI-ESWT) in Men With Erectile Dysfunction Following Radical Prostatectomy. *Sex Med.* 2021; 9: 100338.
27. Fojecki GL, Tiessen S, Osther PJS. Effect of Low-Energy Linear Shockwave Therapy on Erectile Dysfunction: A Double-Blinded, Sham-Controlled, Randomized Clinical Trial. *The Journal of Sexual Medicine.* 2017; 14: 106–12.
28. Banno JJ, Kinnick TR, Roy L, Perito P, Antonini G, Banno D. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma (PRP) as a Supplemental Therapy for the Treatment of Erectile Dysfunction (ED): Initial Outcomes. *The Journal of Sexual Medicine.* 2017; 14: e59–e60.
29. Chen KC, Minor TX, Rahman NU, Ho HC, Nunes L, Lue TF. The additive erectile recovery effect of brain-derived neurotrophic factor combined with vascular endothelial growth factor in a rat model of neurogenic impotence. *BJU international.* 2005; 95: 1077–80.
30. Poullos E, Mykoniatis I, Pyrgidis N, Zilotis F, Kapoteli P, Kotsiris D, et al. Platelet-Rich Plasma (PRP) Improves Erectile Function: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *The Journal of Sexual Medicine.* 2021; 18: 926–35.
31. Huang Y-C, Wu C-T, Chen M-F, Kuo Y-H, Li J-M, Shi C-S. Intracavernous Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma Ameliorates Hyperlipidemia-Associated Erectile Dysfunction in a Rat Model. *Sexual medicine.* 2021; 9: 100317.

32. Geyik S. A single-centre result of two courses of low-intensity shockwave therapy (Li-SWT) in erectile dysfunction. *Andrologia*. 2022; 54: e14324.
33. Pang K, Pan D, Xu H, Ma Y, Wang J, Xu P, et al. Advances in physical diagnosis and treatment of male erectile dysfunction. *Front Physiol*. 2022; 13: 1096741.

References

1. Taş T, Çakıroğlu B, Arda E, Onuk Ö, Nuhuğlu B. Early Clinical Results of the Tolerability, Safety, and Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma Administration in Erectile Dysfunction. *Sex Med*. 2021; 9: 100313.
2. Vance G, Zeigler-Hill V, Shackelford TK. Erectile Dysfunction and Sexual Coercion: The Role of Sperm Competition Risk. *Archives of Sexual Behavior*. 2022; 51 (6): 2781–90.
3. Trebatický B, Žitňanová I, Dvořáková M, Országhová Z, Paduchová Z, Ďuračková Z, et al. Role of oxidative stress, adiponectin and endoglin in the pathophysiology of erectile dysfunction in diabetic and non-diabetic men. *Physiol Res*. 2019; 68: 623–31.
4. Ayta I, McKinlay J, Krane R. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. *BJU international*. 1999; 84: 50–56.
5. Colson MH, Cuzin B, Faix A, Grellet L, Huyghes E. Current epidemiology of erectile dysfunction, an update. *Sexologies*. 2018; 27: e7–e13.
6. Geyik S. Comparison of the efficacy of low-intensity shock wave therapy and its combination with platelet-rich plasma in patients with erectile dysfunction. *Andrologia*. 2021; 53: e14197.
7. Lei H, Liu J, Li H, Wang L, Xu Y, Tian W, et al. Low-Intensity Shock Wave Therapy and Its Application to Erectile Dysfunction. *wjmh*. 2013; 31: 208–14.
8. Liu J, Zhou F, Li G-Y, Wang L, Li H-X, Bai G-Y, et al. Evaluation of the Effect of Different Doses of Low Energy Shock Wave Therapy on the Erectile Function of Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14: 10661–73.
9. Sun D, Junger WG, Yuan C, Zhang W, Bao Y, Qin D, et al. Shockwaves Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Through ATP Release and Activation of P2X7 Receptors. *Stem Cells*; 2013; 31: 1170–80.
10. Mijiritsky E, Assaf HD, Peleg O, Shacham M, Cerroni L, Mangani L. Use of PRP, PRF and CGF in Periodontal Regeneration and Facial Rejuvenation-A Narrative Review. *Biology*. 2021; 10: 317.
11. Bos-Mikich A, de Oliveira R, Frantz N. Platelet-rich plasma therapy and reproductive medicine. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018; 35: 753–6.
12. Mark KP, Arenella K, Girard A, Herbenick D, Fu J, Coleman E. Erectile dysfunction prevalence in the United States: report from the 2021 National Survey of Sexual Wellbeing. *J Sex Med*. 2024; 21: 296–303.
13. Mulhall JP, Goldstein I, Bushmakim AG, Cappelleri JC, Hvidsten K. Validation of the Erection Hardness Score. *The Journal of Sexual Medicine*. 2007; 4: 1626–34.
14. Sokolakis I, Dimitriadis F, Teo P, Hatzichristodoulou G, Hatzichristou D, Giuliano F. The Basic Science Behind Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy for Erectile Dysfunction: A Systematic Scoping Review of Pre-Clinical Studies. *J Sex Med*. 2019; 16: 168–94.
15. Spivak L, Shultz T, Appel B, Verze P, Yagudaev D, Vinarov A. Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy for Erectile Dysfunction in Diabetic Patients. *Sex Med Rev*. 2021; 9: 619–27.
16. Liao C-H, Lee K-H, Chung S-D, Chen K-C, Praveen Rajneesh C, Chen B-H, et al. Intracavernous Injection of Platelet-Rich Plasma Therapy Enhances Erectile Function and Decreases the Mortality Rate in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23: 3017.
17. Ding X-G, Li S-W, Zheng X-M, Hu L-Q, Hu W-L, Luo Y. The effect of platelet-rich plasma on cavernous nerve regeneration in a rat model. *Asian journal of andrology*. 2009; 11: 215–21.
18. Vardi Y, Appel B, Jacob G, Massarwi O, Gruenwald I. Can low-intensity extracorporeal shockwave therapy improve erectile function? A 6-month follow-up pilot study in patients with organic erectile dysfunction. *Eur Urol*. 2010; 58: 243–8.
19. Bella AJ, Lin G, Tantiwongse K, Garcia M, Lin CS, Brant W, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) acts primarily via the JAK/STAT pathway to promote neurite growth in the major pelvic ganglion of the rat: Part I. *The journal of sexual medicine*. 2006; 3: 815–20.
20. Huang Y-C, Wu C-T, Chen M-F, Kuo Y-H, Li J-M, Shi C-S. Intracavernous Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma Ameliorates Hyperlipidemia-Associated Erectile Dysfunction in a Rat Model. *Sexual Medicine*. 2021; 9: 100317.
21. Hafez ES, Hafez SD. Erectile dysfunction: anatomical parameters, etiology, diagnosis, and therapy. *Arch Androl*. 2005; 51: 15–31.
22. Seftel AD. Erectile dysfunction in the elderly: epidemiology, etiology and approaches to treatment. *J Urol*. 2003; 169: 1999–2007.
23. Miner M, Billups KL. Erectile Dysfunction and Dyslipidemia: Relevance and Role of Phosphodiesterase Type-5 Inhibitors and Statins. *The Journal of Sexual Medicine*. 2008; 5: 1066–78.
24. Frey A, Sørnksen J, Fode M. Low-intensity extracorporeal shockwave therapy in the treatment of postprostatectomy erectile dysfunction: a pilot study. *Scand J Urol*. 2016; 50: 123–7.
25. Akande TO, Akinwunmi OM, Adebayo SA, Akinyinka AO, Shittu OB. Efficacy and safety of low-intensity extracorporeal shockwave therapy for treatment of vascular erectile dysfunction in nigerian men: Report of a study in Ibadan, South-West Nigeria. *Ann Ib Postgrad Med*. 2021; 19: 8–14.
26. Ladegaard PBJ, Mortensen J, Skov-Jepesen SM, Lund L. Erectile Dysfunction A Prospective Randomized Placebo-Controlled Study Evaluating the Effect of Low-Intensity Extracorporeal Shockwave Therapy (LI-ESWT) in Men With Erectile Dysfunction Following Radical Prostatectomy. *Sex Med*. 2021; 9: 100338.
27. Fojecki GL, Tiessen S, Osther PJS. Effect of Low-Energy Linear Shockwave Therapy on Erectile Dysfunction—A Double-Blinded, Sham-Controlled, Randomized Clinical�Trial. *The Journal of Sexual Medicine*. 2017; 14: 106–12.
28. Banno JJ, Kinnick TR, Roy L, Perito P, Antonini G, Banno D. 146 The Efficacy of Platelet-Rich Plasma (PRP) as a Supplemental Therapy for the Treatment of Erectile Dysfunction (ED): Initial Outcomes. *The Journal of Sexual Medicine*. 2017; 14: e59–e60.
29. Chen KC, Minor TX, Rahman NU, Ho HC, Nunes L, Lue TF. The additive erectile recovery effect of brain-derived neurotrophic factor combined with vascular endothelial growth factor in a rat model of neurogenic impotence. *BJU international*. 2005; 95: 1077–80.
30. Poulos E, Mykoniatis I, Pyrgidis N, Zilotis F, Kapoteli P, Kotsiris D, et al. Platelet-Rich Plasma (PRP) Improves Erectile Function: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *The Journal of Sexual Medicine*. 2021; 18: 926–35.
31. Huang Y-C, Wu C-T, Chen M-F, Kuo Y-H, Li J-M, Shi C-S. Intracavernous Injection of Autologous Platelet-Rich Plasma Ameliorates Hyperlipidemia-Associated Erectile Dysfunction in a Rat Model. *Sexual medicine*. 2021; 9: 100317.
32. Geyik S. A single-centre result of two courses of low-intensity shockwave therapy (Li-SWT) in erectile dysfunction. *Andrologia*. 2022; 54: e14324.
33. Pang K, Pan D, Xu H, Ma Y, Wang J, Xu P, et al. Advances in physical diagnosis and treatment of male erectile dysfunction. *Front Physiol*. 2022; 13: 1096741.

ДИНАМИКА МАРКЕРОВ ВОСПАЛЕНИЯ НА НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА

М. В. Осиков^{1,2}, Л. А. Эфрос^{1,2}, Л. Ю. Журавлева^{1,2}✉, А. А. Федосов³

¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

² Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

³ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

Сахарный диабет (СД) — один из основных факторов, способствующих развитию и усугублению хронической болезни почек (ХБП). Точные и удобные маркеры для раннего выявления, оценки прогрессирования и надлежащего контроля терапии ХБП у лиц с СД ограничены показателями скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и альбуминурией. В связи с ролью хронического воспаления в патогенезе СД и ХБП целью работы было изучить показатели воспалительного процесса и их взаимосвязь с СКФ у больных СД 1-го типа (СД1) при ранних стадиях ХБП. В исследовании участвовали здоровые люди ($n = 14$), больные СД1 без признаков ХБП ($n = 30$), а также больные СД1 с 1-й стадией ХБП ($n = 60$), 2-й стадией ХБП ($n = 38$) и 3-й стадией ХБП ($n = 31$). СКФ рассчитывали по формуле СКД-EPI (pСКФ), в сыворотке иммуноферментным методом определяли концентрацию IL1 β и TNF α , C-реактивного белка (С-РБ), а также концентрацию церулоплазмينا (ЦП), рассчитывали индекс нейтрофилы/лимфоциты, лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ). Установлено, что в сыворотке повышается концентрация IL1 β , TNF α , С-РБ и ЦП, увеличивается ЛИИ, индекс нейтрофилы/лимфоциты. Выраженность воспалительного процесса и острофазового ответа прогрессирует и максимальна при 3б стадии ХБП, когда концентрация в сыворотке IL1 β увеличивается в 2,4 раза ($p = 0,042$), TNF α — на 34% ($p = 0,005$), С-РБ — в 33 раза ($p < 0,000$), ЦП — на 73% ($p = 0,008$), ЛИИ — в 8,4 раза ($p < 0,000$), индекс нейтрофилы/лимфоциты — в 5 раз ($p = 0,013$). Интегральный показатель функции почек pСКФ снижается по мере увеличения содержания в сыворотке вышеперечисленных показателей. Таким образом IL1 β , TNF α , С-РБ, ЦП, ЛИИ и индекс нейтрофилы/лимфоциты можно считать доступными и информативными показателями оценки воспалительного процесса, возрастающими по мере прогрессирования начальных стадий ХБП у больных СД1.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, хроническая болезнь почек, прогрессирование, С-реактивный белок, церулоплазмин, IL1 β , TNF α , нейтрофилы

Вклад авторов: М. В. Осиков, Л. А. Эфрос — планирование исследования, разработка концепции и дизайна исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; Л. Ю. Журавлева — сбор данных, статистическая обработка, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. А. Федосов — анализ литературы, интерпретация данных, подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 10 июня 2024 г.); проведено в соответствии со стандартами надлежащей клинической практики и принципами Хельсинкской декларации.

✉ **Для корреспонденции:** Людмила Юрьевна Журавлева
ул. Воровского, 70 (Медгородок), корпус 8, 454048, г. Челябинск, Россия; milana_1610@mai.ru

Статья получена: 24.10.2024 **Статья принята к печати:** 25.11.2024 **Опубликована онлайн:** 21.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.060

DYNAMIC CHANGES OF INFLAMMATORY MARKERS IN THE EARLY STAGES OF CHRONIC KIDNEY DISEASE IN PATIENTS WITH TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Osikov MV^{1,2}, Efros LA^{1,2}, Zhuravleva LYu^{1,2}✉, Fedosov AA³

¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Diabetes mellitus (DM) is one of the major factors contributing to the development and aggravation of chronic kidney disease (CKD). The accurate and convenient markers for early detection, estimation of progression, and adequate control of CKD therapy in individuals with DM are limited to glomerular filtration rate (GFR) and albuminuria. Given the role of chronic inflammation in the pathogenesis of DM and CKD, the study aimed to assess indicators of inflammation and the correlation of those with GFR in patients with type 1 DM (T1D) and early stage CKD. The study involved healthy individuals ($n = 14$), patients with T1D showing no signs of CKD ($n = 30$), as well as patients with T1D and stage 1 CKD ($n = 60$), stage 2 CKD ($n = 38$), and stage 3 CKD ($n = 31$). GFR was calculated using the formula CKD-EPI (eGFR); serum levels of IL1 β and TNF α , C-reactive protein (CRP), and ceruloplasmin (CP) were determined by enzyme immunoassay; the neutrophil-to-lymphocyte index and the leukocyte intoxication index (LII) were calculated. It has been found that serum concentrations of IL1 β , TNF α , CRP, and CP are elevated; LII and the neutrophil-to-lymphocyte index are increased. The inflammation and acute phase response severity progresses and reaches its maximum in stage 3b CKD, when the serum concentration of IL1 β is increased 2.4-fold ($p = 0.042$), TNF α concentration by 34% ($p = 0.005$), CRP concentration 33-fold ($p < 0.000$), CP concentration by 73% ($p = 0.008$), LII 8.4-fold ($p < 0.000$), neutrophil-to-lymphocyte index 5-fold ($p = 0.013$). The integral kidney function indicator, eGFR, decreases with increasing serum levels of the above indicators. Thus, IL1 β , TNF α , CRP, CP, LII, and the neutrophil-to-lymphocyte index can be considered as affordable and informative indicators for estimation of inflammation, the levels of which increase with progression of early stage CKD in patients with T1D.

Keywords: type I diabetes mellitus, chronic kidney disease, progression, C-reactive protein, ceruloplasmin, IL1 β , TNF α , neutrophils

Author contribution: Osikov MV, Efros LA — study planning, developing the study concept and design, literature review, data interpretation, manuscript draft writing; Zhuravleva LYu — data acquisition, statistical processing, and interpretation, manuscript writing; Fedosov AA — literature review, data interpretation, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University (protocol No. 5 dated 10 June 2024) and conducted in accordance with Good Clinical Practice and the principles of the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lyudmila Yu. Zhuravleva
Vorovsky, 70 (Medgorodok), korp. 8, 454048, Chelyabinsk, Russia; milana_1610@mai.ru

Received: 24.10.2024 **Accepted:** 25.11.2024 **Published online:** 21.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.060

Сахарный диабет (СД) — одна из основных причин преждевременной смерти от хронических неинфекционных заболеваний, на его долю приходится около 1,5 млн смертей ежегодно. Общая численность пациентов с СД в РФ в 2023 г. составила 4,9 млн, или 3,31% населения, из них СД 1-го типа (СД1) — 277,1 тыс. Несмотря на достижения в диагностике и терапии наблюдается рост распространенности СД1 примерно на 2–3% в год, в 2022 г. она составила 191 случай на 100 тыс. [1].

Большая часть больных СД1 находится в наиболее трудоспособном возрасте (30–39 лет), средний возраст смерти при СД1 составляет 53,2 года. Одно из частых микрососудистых осложнений СД — диабетическая нефропатия, она возникает в среднем у 40% больных, ее частота при СД1 составляет 50% через 10 лет и 75% через 20 лет [2]. По информации Организации Объединенных Наций, хроническая болезнь почек (ХБП) требует особого внимания и является одним из показателей прогресса в достижении мировых целей по уменьшению преждевременной смертности от неинфекционных заболеваний к 2030 г. [1, 3]. Подчеркивается важность выявления факторов риска для предотвращения прогрессирования ХБП с учетом ее возрастающего влияния на здоровье населения [4]. Доказано, что целенаправленные вмешательства на ранней стадии ХБП при СД1 эффективно предотвращают прогрессирование почечной недостаточности и улучшают результаты лечения пациентов, регулярный скрининг на ХБП является основополагающим принципом ведения пациентов с СД [5]. До настоящего времени окончательный патогенез ХБП при СД не ясен и включает такие механизмы как эндотелиальная дисфункция, хроническое воспаление и тромбоз, дисфункция митохондрий и окислительный стресс, гиперметилирование гистонов, метилирование ДНК, атерогенная дислипидемия и артериальная гипертензия и др., а понимание синергичных молекулярно-клеточных механизмов при СД и ХБП имеет решающее значение для оценки прогрессирования ХБП при СД, разработки эффективных диагностических и терапевтических подходов [3, 6].

Воспаление — типовой патологический процесс, лежащий в основе многих заболеваний и синдромов, в том числе СД и ХБП. Особое внимание уделяется системному хроническому низкоинтенсивному воспалению и его маркерам: провоспалительным цитокинам (интерлейкину 1β (IL 1β) и фактору некроза опухоли — (TNF α), IL6 и др.), реактантам острой фазы (высокочувствительному С-реактивному белку (С-РБ), сывороточному амилоиду А, церулоплазмину (ЦП) и др.) [7, 8]. Хроническое воспаление рассматривают как ключевой фактор в патогенезе макро- и микрососудистых осложнений СД, включая ХБП [9]. В то же время в клинических условиях наиболее доступным методом оценки выраженности воспалительного и острофазового ответа остается подсчет лейкоцитарной формулы (увеличение молодых форм нейтрофилов) и ее производных (лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ), индекс нейтрофилов/лимфоцитов), что весьма информативно в прогностическом плане долгосрочной выживаемости, летальности и для ранжирования факторов, способствующих сердечно-сосудистым болезням [10]. Большая часть информации о взаимосвязи воспалительных маркеров в крови с развитием и ухудшением диабетической нефропатии была собрана у пациентов, страдающих СД2, что обусловлено высокой его распространенностью.

Цель работы — исследовать показатели воспалительного процесса и их взаимосвязь со скоростью клубочковой

фильтрации у больных СД1 на начальных стадиях хронической болезни почек.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на базе ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России. В исследовании принимали участие женщины в возрасте от 18 до 54 лет, мужчины в возрасте от 18 до 60 лет. Критерии включения: 1) наличие СД1 более 6 месяцев в соответствии с национальными клиническими рекомендациями [11]; 2) информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: 1) возраст старше 60 лет; 2) рСКФ ≤ 29 мл/мин/1,73 м²; 3) наличие СД2 и других эндокринологических заболеваний; 4) тяжелые сопутствующие заболевания печени, легких, туберкулез, ревматологические заболевания, аутоиммунные заболевания почек, постменопаузальный остеопороз, онкологические заболевания; 5) прием глюкокортикоидов, цитостатиков, препаратов витамина D, фосфатбиндеров; 6) пациенты с воспалительными заболеваниями почек, а также других органов и систем. Группа 1 представлена клинически здоровыми людьми, сопоставима по возрасту и полу с основной группой ($n = 14$): мужчин 42,9%, женщин 57,1%, средний возраст $30,6 \pm 4,2$ лет, показатели индекса массы тела, систолического и диастолического артериального давления, липидограммы в пределах нормальных значений. Группа 2 включает больных СД1 без признаков ХБП ($n = 30$). Группа 3 представлена больными СД1 с признаками ХБП ($n = 129$), в том числе 1-я стадия ХБП (группа 3.1; $n = 60$), 2-я стадия ХБП (группа 3.2; $n = 38$), 3а стадия ХБП (группа 3.3; $n = 21$), 3б стадия ХБП (группа 3.3; $n = 10$). Стадию ХБП устанавливали в соответствии с национальными клиническими рекомендациями [12]. Больные СД1 находились в состоянии компенсации ($n = 12$; 7,5%), субкомпенсации и декомпенсации при поступлении в стационар, на фоне терапии в стационаре достигнута компенсация, маркеры воспаления брали перед выпиской ($n = 147$; 92,5%). Клиническая характеристика групп пациентов СД1 с ХБП и без ХБП представлена в табл. 1.

Анализ результатов показал, что в группе пациентов с ХБП достоверно ниже рСКФ, чем у пациентов с отсутствием ХБП ($p = 0,037$). Стаж диабета в группе пациентов с ХБП составил 13 лет, тогда как в группе пациентов с отсутствием ХБП этот показатель был статистически значимо ниже ($p = 0,000$). Выявлены статистически значимые различия по среднему уровню гликированного гемоглобина у пациентов с наличием и отсутствием ХБП (9,8% и 8,1% соответственно). Величина среднего систолического и диастолического артериального давления в группе пациентов с ХБП была выше ($p = 0,000$), отмечены более высокие показатели общего холестерина в группе пациентов с ХБП ($p = 0,035$).

Анализ результатов показал, что более длительный стаж СД у пациентов с ХБП 1-й стадии, чем у пациентов с отсутствием ХБП ($p < 0,001$). Величина средних показателей систолического артериального давления в группе пациентов с ХБП 1-й стадии оказалась статистически значимо выше ($p = 0,001$). У больных СД1 с ХБП 2-й стадии в сравнении с пациентами с отсутствием ХБП рСКФ была ниже ($p = 0,000$). Стаж диабета был выше у пациентов с ХБП 2-й стадии ($p = 0,000$). У пациентов с ХБП 2-й стадии статистически значимо был выше средний показатель гликированного гемоглобина ($p = 0,012$) и средний уровень общего холестерина ($p = 0,007$). Значения

Таблица 1. Клиническая характеристика и сравнительный анализ группы пациентов СД1 с наличием и отсутствием ХБП ($n = 159$)

Показатель		Группа с ХБП ($n = 129$)	Группа без ХБП ($n = 30$)	p
Пол, абс. ч. (%)	Мужчины	47 (36,4)	12 (40,0)	0,834
	Женщины	82 (63,6)	18 (60,0)	
Возраст, лет, Ме [Q ₁ ; Q ₃]		32,0 [25,0; 40,0]	26,0 [22,0; 30,0]	0,001*
Индекс массы тела, кг/м ² , Ме [Q ₁ ; Q ₃]		23,7 [21,0; 26,0]	22,7 [20,0; 24,3]	0,163
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст., Ме [Q ₁ ; Q ₃]		150,0 [110,0; 160,0]	110,0 [100,0; 110,0]	0,000*
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст., Ме [Q ₁ ; Q ₃]		90,0 [70,0; 90,0]	70,0 [60,0; 70,0]	0,000*
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин/1,73 м ² , Ме [Q ₁ ; Q ₃]		87 [62,0; 111,0]	121,0 [96,0; 124,0]	0,000*
Стаж диабета, лет, Ме [Q ₁ ; Q ₃]		13 [8,0; 20,0]	4,0 [2,0; 8,0]	0,000*
Гликированный гемоглобин, %, Ме [Q ₁ ; Q ₃]		9,8 [8,5; 11,6]	8,1 [7,6; 8,8]	0,000*
Общий холестерин, ммоль/л, Ме [Q ₁ ; Q ₃]		5,2 [4,2-6,3]	4,5 [4,1; 5,5]	0,035*
Триглицериды, ммоль/л, Ме [Q ₁ ; Q ₃]		1,3 [0,8; 1,8]	1,1 [0,8; 1,6]	0,388
Холестерин ЛПНП, ммоль/л, Ме [Q ₁ ; Q ₃]		3,0 [2,2; 4,0]	2,9 [2,1; 3,5]	0,34
Холестерин ЛПОНП, ммоль/л, Ме [Q ₁ ; Q ₃]		0,58 [0,35; 0,76]	0,57 [0,40; 0,69]	0,631

Примечание: * — статистически значимые межгрупповые различия ($p < 0,05$). При статистических сравнениях категориальных показателей использовали критерий χ^2 Пирсона, в остальных случаях — критерий Манна-Уитни

среднего систолического и диастолического АД в группе с ХБП 2-й стадии оказались статистически значимо выше, чем в группе с отсутствием ХБП ($p = 0,001$ и $p < 0,001$). При сравнении группы пациентов с ХБП 3-й стадии и с отсутствием ХБП имелись статистически значимые различия. В группе пациентов с ХБП 3-й стадии средний возраст был выше ($p = 0,015$). Более длительный стаж диабета отмечен у пациентов с ХБП 3-й стадии ($p = 0,001$). Значения среднего систолического и диастолического АД оказались статистически значимо выше в группе пациентов с ХБП 3-й стадии ($p < 0,001$), уровень гликированного гемоглобина был выше у пациентов с ХБП 3-й стадии ($p = 0,010$). Результаты сравнительного анализа группы пациентов с ХБП 2-й стадии с группой пациентов с ХБП 3-й стадии показали статистически значимое снижение среднего уровня скорости клубочковой фильтрации ($p < 0,001$).

Показатели альбуминурии как маркеры ХБП представлены в табл. 2.

Отмечено, что достоверно больше при ХБП 1-й стадии пациентов с альбуминурией А1 стадии ($p = 0,031$), в то время как при ХБП 3а и 3б стадий — с альбуминурией А3 стадии ($p = 0,022$).

Для расчета СКФ по формуле СКД-ЕРП (рСКФ) определяли концентрацию креатинина в сыворотке кинетическим колориметрическим методом на анализаторе «Cobas Integra 400» (Швейцария) [2]. Общее число

лейкоцитов в крови определяли на гематологическом анализаторе «Coulter LH 500» («BeckmanCoulter», США), лейкоцитарную формулу — при микроскопии окрашенных по Романовскому-Гимзе мазков крови с подсчетом 200 клеток. Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) рассчитывали по формуле:

$$\frac{4 \times \text{миелоц.} + 3 \times \text{юные} + 2 \times \text{палочкояд.} + \text{сегментояд. нейтрофилы} \times (\text{плазм. кл.} + 1)}{\text{лимф.} + \text{мон.} \times (\text{эозинофилы} + 1)} [13].$$

Кроме этого, определяли отношение количества в крови всех популяций нейтрофилов и лимфоцитов (нейтрофилы/лимфоциты). Концентрацию в сыворотке IL1 β и TNF α определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Personal LAB» (Adaltis Italia, Италия) с помощью тест-систем АО «Вектор-Бест» (Новосибирск), результаты выражали в пг/мл. Концентрацию в сыворотке высокочувствительного С-РБ определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «ChemWell 2910» (Awareness technology, США) с помощью тест-системы АО «Вектор-Бест» (Новосибирск), результаты выражали в МЕ/л. Концентрацию в сыворотке церулоплазмينا (ЦП) определяли на спектрофотометре «СФ-56» («ЛОМО-Спектр», Россия) модифицированным методом по Ревину, основанным на окислении р-фенилендиамина, результаты выражали в мг/л [14]. Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета

Таблица 2. Показатели альбуминурии у пациентов с СД1 и ХБП, абс. ч. (%)

Стадия альбуминурии	Группа 3				p
	1-я стадия ХБП (3.1)	2-я стадия ХБП (3.2)	3а стадия ХБП (3.3)	3б стадия ХБП (3.4)	
A1	24 (40,0)	13 (34,2)	6 (28,6)	0	0,031*
A2	17 (28,3)	12 (31,6)	4 (19,0)	4 (40,0)	0,649
A3	19 (31,7)	13 (34,2)	11 (52,4)	6 (60,0)	0,022*

Примечание: * — статистически значимые межгрупповые различия ($p < 0,05$). При статистических сравнениях категориальных показателей использовали критерий χ^2 Пирсона

Таблица 3. рСКФ (мл/мин/1,73 м²) у больных СД1 и ХБП, Ме [Q₁; Q₃]

Здоровые (группа 1)	Без ХБП (группа 2)	Группа 3				Значения p при условии $p < 0,05$
		1-я стадия ХБП (группа 3.1)	2-я стадия ХБП (группа 3.2)	3а стадия ХБП (группа 3.3)	3б стадия ХБП (группа 3.4)	
105,000 [91,000; 118,000]	123,000 [120,000; 134,000]	94,000 [92,000; 126,000]	76,000 [67,000; 78,000]	56,000 [50,000; 58,000]	37,000 [31,000; 40,000]	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3.1} < 0,001$ $p_{1-3.2} < 0,001$ $p_{1-3.3} < 0,001$ $p_{1-3.4} < 0,001$ $p_{2-3.1} = 0,016$ $p_{2-3.2} < 0,001$ $p_{2-3.3} < 0,001$ $p_{2-3.4} < 0,001$ $p_{3.1-3.2} < 0,001$ $p_{3.1-3.3} < 0,001$ $p_{3.1-3.4} < 0,001$ $p_{3.2-3.3} < 0,001$ $p_{3.2-3.4} < 0,001$ $p_{3.3-3.4} < 0,001$

Примечание: при статистических сравнениях показателей использовали критерий Манна–Уитни.

«IBM SPSS Statistics v. 23» («SPSS: An IBM Company», США). Нормальность распределения количественных показателей в группе пациентов с ХБП 1-й стадии проверяли по критерию Колмогорова–Смирнова, в группах с ХБП 2-й, 3а и 3б стадиями, а также у здоровых людей и пациентов без ХБП — с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде Ме (Q₁; Q₃), где Ме — медиана, Q₁ и Q₃ — значение нижнего (25) и верхнего (75) квартилей соответственно. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Для выявления взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R), для оценки силы связи — шкалу Чеддока.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значения рСКФ в исследуемых группах больных представлены в табл. 3. Обнаружено, что по сравнению с группой здоровых лиц рСКФ значительно повышается в группе больных с СД1 без признаков ХБП (группа 2) и закономерно снижается в группе больных с ХБП (группа 3). Причем в группе 2 повышение составляет 17% по медиане относительно значений в группе здоровых лиц, а снижение в группе 3.1 (ХБП 1-й стадии) — на 10%, в группе 3.2 (ХБП 2-й стадии) — на 28%, в группе 3.3 (ХБП 3а стадии) — на 46%, в группе 3.4 (ХБП 3б стадии) — на 65%. Кроме этого, в группах 3.1, 3.2, 3.3 и 3.4 рСКФ значительно снижается и по сравнению с группой 2. Значения рСКФ в группах 3.1, 3.2, 3.3 и 3.4 соответствуют критериям ХБП стадии 1, стадии 2, стадии 3а, стадии 3б соответственно [12]. Значение рСКФ у больных ХБП 2-й стадии значительно отличается от значений в группе больных ХБП 1-й стадии, у больных ХБП 3а стадии — от значений в группе больных ХБП 1-й и 2-й стадии, у больных ХБП 3б стадии — от значений в группе больных ХБП 1-й, 2-й и 3а стадии.

Результаты исследования выраженности воспалительного процесса у больных СД1 и ХБП приведены в табл. 4. Прежде всего следует отметить изменение концентрации в сыворотке провоспалительных цитокинов. Так, концентрация IL1 β в группе больных с СД1 без признаков ХБП значительно увеличилась на 31% по медиане относительно значений в группе здоровых лиц; в группе больных с СД1 и ХБП концентрация IL1 β прогрессивно возрастала от стадии 1 к стадии 3б: в группе 3.1 — на 40% по медиане относительно значений в группе здоровых лиц, в группе 3.2 — на 91%, в группе 3.3 — в 1,8 раза и в группе 3.4 — в 2,4 раза.

Обнаружены достоверные изменения концентрации в сыворотке IL1 β при ХБП 2-й, 3а и 3б стадии по сравнению с группой больных СД1 без признаков ХБП и группой больных с ХБП 1-й стадии, а также при ХБП 3а стадии — по сравнению с ХБП 2-й стадии, ХБП 3б стадии — по сравнению с ХБП 2-й и 3а стадии. Концентрация в сыворотке TNF α значимо не отличалась относительно данных в группе здоровых лиц у больных с СД1 без признаков ХБП и больных с СД1 и ХБП 1-й и 2-й стадии, а у больных с СД1 и ХБП 3а и 3б стадии увеличивалась на 34% по медиане. Выявлены изменения концентрации в сыворотке TNF α при ХБП 2-й, 3а и 3б стадии по сравнению с группой больных СД1 без признаков ХБП и группой больных с ХБП 1-й стадии, а также при ХБП 3б стадии — по сравнению с ХБП 2-й стадии.

Выраженность острофазового ответа при СД1, в том числе при сочетании с ХБП, включала изменение содержания популяций лейкоцитов в периферической крови, что, в частности, проявилось изменением ЛИИ и индекса нейтрофилы/лимфоциты. Так, ЛИИ значимо увеличивался в группах больных с СД1 и ХБП 2-й, 3а и 3б стадии соответственно в 2,3 раза, в 7,8 раза, в 8,4 раза по медиане относительно значений в группе здоровых лиц. Кроме этого, ЛИИ значимо увеличивался в группах больных с СД1 и ХБП 2-й, 3а и 3б стадии относительно больных с СД1 без признаков ХБП и с ХБП 1-й стадии. При СД1 и ХБП 3а и 3б стадии ЛИИ возрастал при сравнении с группой ХБП 2-й стадии. Более выраженные изменения популяционного спектра лейкоцитов в крови зафиксированы при оценке индекса нейтрофилы/лимфоциты. У больных с СД1 и ХБП индекс значимо возрастал по сравнению с группой здоровых лиц; в группе 3.1 — на 22% по медиане, в группе 3.2 — на 81%, в группе 3.3 — в 2,3 раза и в группе 3.4 — в 5 раз. Отмечено достоверное повышение индекса нейтрофилы/лимфоциты у больных с СД1 и ХБП 1-й, 2-й, 3а и 3б стадии по сравнению с группой больных с СД1 без признаков ХБП, а также у больных с СД1 и ХБП 3а и 3б стадии по сравнению с больными с СД1 и ХБП 1-й и 2-й стадии; у больных с СД1 и ХБП 3б стадии по сравнению с больными 3а стадии. Отмечено увеличение IL1 β и TNF α с прогрессированием ХБП у пациентов с СД1, но в пределах нормальных показателей, что требует постоянного контроля за данными показателями.

На следующем этапе оценивали концентрацию в сыворотке реактантов острой фазы С-РБ и ЦП (табл. 5). Обнаружено увеличение концентрации С-РБ у больных

Таблица 4. Маркеры воспалительного процесса у больных СД1 и ХБП, Me [Q₁; Q₃]

Показатели	Здоровые (группа 1)	Без ХБП (группа 2)	Группа 3				Значения p при условии p < 0,05
			1-я стадия ХБП (3.1)	2-я стадия ХБП (3.2)	3а стадия ХБП (3.3)	3б стадия ХБП (3.4)	
IL1β, пг/мл	1,724 [1,553; 2,931]	2,226 [1,410; 2,941]	2,405 [1,930; 3,600]	3,276 [2,590; 6,650]	4,879 [2,241; 7,379]	5,824 [4,793; 8,031]	p ₁₋₂ = 0,021 p _{1-3.1} = 0,009 p _{1-3.2} = 0,003 p _{1-3.3} = 0,003 p _{1-3.4} = 0,029 p _{2-3.2} = 0,006 p _{2-3.3} = 0,046 p _{2-3.4} = 0,004 p _{3.1-3.2} = 0,044 p _{3.1-3.3} = 0,033 p _{3.1-3.4} = 0,042 p _{3.2-3.3} = 0,001 p _{3.2-3.4} = 0,003 p _{3.3-3.4} = 0,301
TNFα, пг/мл	2,264 [1,981; 2,642]	2,170 [1,415; 3,019]	2,264 [1,604; 2,736]	2,443 [2,358; 3,113]	3,019 [2,547; 3,491]	3,019 [2,311; 3,490]	p _{1-3.3} = 0,001 p _{1-3.4} < 0,000 p _{2-3.2} = 0,005 p _{2-3.3} = 0,047 p _{2-3.4} < 0,000 p _{3.1-3.2} = 0,044 p _{3.1-3.3} = 0,003 p _{3.1-3.4} = 0,005 p _{3.2-3.4} = 0,003
ЛИИ, у.е.	0,320 [0,170; 0,690]	0,560 [0,450; 0,750]	0,485 [0,200; 0,800]	1,050 [0,690; 1,350]	2,800 [1,860; 8,700]	3,000 [1,520; 6,400]	p _{1-3.2} = 0,004 p _{1-3.3} < 0,000 p _{1-3.4} < 0,000 p _{2-3.2} = 0,016 p _{2-3.3} < 0,000 p _{2-3.4} < 0,000 p _{3.1-3.2} = 0,027 p _{3.1-3.3} = 0,001 p _{3.1-3.4} < 0,000 p _{3.2-3.3} = 0,002 p _{3.2-3.4} = 0,008
Нейтрофилы / лимфоциты, у.е.	1,720 [1,020; 1,930]	1,680 [1,200; 2,100]	2,100 [1,530; 5,700]	3,160 [2,800; 3,900]	5,600 [3,200; 5,700]	10,295 [2,390; 12,680]	p _{1-3.1} = 0,021 p _{1-3.2} < 0,000 p _{1-3.3} < 0,000 p _{1-3.4} < 0,000 p _{2-3.1} = 0,001 p _{2-3.2} < 0,000 p _{2-3.3} = 0,003 p _{2-3.4} = 0,001 p _{3.1-3.3} = 0,004 p _{3.1-3.4} = 0,013 p _{3.2-3.3} = 0,001 p _{3.2-3.4} = 0,002 p _{3.3-3.4} = 0,020

Примечание: при статистических сравнениях показателей использовали критерий Манна–Уитни

СД1 без признаков ХБП, а также у больных СД1 и ХБП 1-й, 2-й, 3а и 3б стадии относительно группы здоровых лиц соответственно в 2,7 раза, в 3,5 раза, в 5,1 раза, в 9,9 раза, в 33 раза по медиане. Во всех группах больных с признаками ХБП содержание в сыворотке С-РБ увеличивалось по сравнению с группой больных СД1 без признаков ХБП; в группах с СД1 и ХБП 3а и 3б стадии по сравнению с СД1 и ХБП 1-й, 2-й стадии, в группе с СД1 и ХБП 3б стадии по сравнению с СД1 и ХБП 3а стадии. Выявлено повышение концентрации в сыворотке ЦП у больных СД1 без признаков ХБП, а также у больных СД1 и ХБП 1-й, 2-й, 3а и 3б стадии относительно группы здоровых лиц соответственно на 31%, 16%, 24%, 41% и 73% по медиане. Содержание в сыворотке ЦП увеличивалось в группах с СД1 и ХБП 3а и 3б стадии по сравнению с группой больных СД1 без признаков ХБП, а также СД1 и ХБП 1-й стадии; в группе с СД1 и ХБП 3а стадии по сравнению с СД1 и ХБП 2-й стадии; в группе с СД1 и ХБП 3б стадии по сравнению с СД1 и ХБП 3а стадии. Отмечено нарастание ЦП с увеличением стадии ХБП, но в

пределах нормальных значений, в связи с чем необходимо динамическое наблюдение за этим маркером.

Нами проведен корреляционный анализ между рСКФ — одним из ключевых параметров функции почек, который необходим для оценки прогрессирования ХБП, установления ее стадии в соответствии с национальными и международными критериями и признаками воспалительного процесса у больных СД1 и начальными стадиями ХБП (табл. 6). При ХБП 1-й стадии выявлены в соответствии со шкалой Чеддока умеренная связь с концентрацией в сыворотке TNFα, заметная связь с ЛИИ и индексом нейтрофилы/лимфоциты, очень высокая связь с концентрацией в сыворотке IL1β, С-РБ и ЦП, все связи обратные. При ХБП 2-й стадии обнаружены заметная связь с концентрацией в сыворотке TNFα, высокая связь с ЛИИ и индексом нейтрофилы/лимфоциты, очень высокая связь с концентрацией в сыворотке IL1β, С-РБ и ЦП, при ХБП 2-й стадии все связи обратные. При ХБП 3а стадии обнаружены высокая связь с ЛИИ и концентрацией в сыворотке ЦП, очень высокая связь с концентрацией

Таблица 5. Маркеры — реактанты острой фазы у больных СД1 и ХБП, Ме [Q₁; Q₃]

Показатели	Здоровые (группа 1)	Без ХБП (группа 2)	Группа 3				Значения p при условии $p < 0,05$
			1-я стадия ХБП (3.1)	2-я стадия ХБП (3.2)	3а стадия ХБП (3.3)	3б стадия ХБП (3.4)	
ЦП, мг/л	172,050 [132,100; 217,000]	225,800 [183,800; 317,000]	200,150 [181,100; 245,000]	214,400 [198,000; 289,300]	242,300 [152,300; 245,000]	297,550 [268,400; 311,000]	$p_{1-2} = 0,014$ $p_{1-3.1} = 0,001$ $p_{1-3.2} = 0,003$ $p_{1-3.3} = 0,004$ $p_{1-3.4} = 0,029$ $p_{2-3.3} = 0,027$ $p_{2-3.4} = 0,001$ $p_{3.1-3.3} = 0,004$ $p_{3.1-3.4} = 0,008$ $p_{3.2-3.3} = 0,004$ $p_{3.2-3.4} = 0,042$ $p_{3.3-3.4} = 0,008$
С-РБ, МЕ/л	0,335 [0,280; 1,820]	1,260 [0,140; 2,300]	1,540 [1,000; 3,050]	2,050 [1,450; 3,170]	3,675 [2,800; 4,150]	11,625 [6,010; 15,395]	$p_{1-2} = 0,003$ $p_{1-3.1} = 0,041$ $p_{1-3.2} = 0,020$ $p_{1-3.3} = 0,001$ $p_{1-3.4} < 0,000$ $p_{2-3.1} = 0,021$ $p_{2-3.2} = 0,002$ $p_{2-3.3} = 0,047$ $p_{2-3.4} < 0,000$ $p_{3.1-3.4} < 0,000$ $p_{3.2-3.3} = 0,001$ $p_{3.2-3.4} = 0,001$ $p_{3.3-3.4} = 0,039$

Примечание: при статистических сравнениях показателей использовали критерий Манна–Уитни.

в сыворотке IL1 β , TNF α , С-РБ и индексом нейтрофилы/лимфоциты. При ХБП 3б стадии обнаружены высокая связь с концентрацией в сыворотке TNF α , С-РБ и ЦП, очень высокая связь с концентрацией в сыворотке IL1 β , ЛИИ и индексом нейтрофилы/лимфоциты, обратная связь.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При оценке рСКФ выявлено ее повышение в группе больных СД1 без признаков ХБП (группа 2). Увеличение рСКФ и гиперфилтрация при СД1 (с максимальными значениями до 162 мл/мин/1,73 м²) встречаются у 10–67% пациентов и рассматриваются как результат компенсаторной гипертрофии и гиперфункции почек в ответ на гипергликемию, эффекты провоспалительных цитокинов и факторов роста, локального ангиотензина (II), дисбаланса вазоактивных факторов регуляции пре- и постгломерулярного кровотока, изменение реабсорбции натрия, глюкозы и H⁺ в проксимальных участках нефрона [15, 16]. В настоящее время внутриклубочковую

гиперфилтрацию рассматривают как один из основных механизмов возникновения и прогрессирования диабетической болезни почек (ДБП) [16, 17].

Патогенез обнаруженных нами у больных СД1 и ХБП признаков воспаления в виде увеличения концентрации в сыворотке IL1 β , TNF α , С-РБ, ЦП, увеличения ЛИИ и индекса нейтрофилы/лимфоциты является многофакторным [18]. Механизм формирования флогогенного потенциала при СД включает, во-первых, гипергликемию, которая приводит к гликозилированию белков, образованию конечных продуктов гликирования, вызывающих повреждение тканей и активацию иммунных клеток, высвобождение провоспалительных цитокинов. Во-вторых, при СД избыточное количество глюкозы приводит к повышенному образованию реактивных форм кислорода, оксидативному стрессу, что дополнительно повреждает клетки почек и провоцирует воспаление. В-третьих, при диабетической нефропатии наблюдается гиперактивация ренин-ангиотензиновой системы, что не только способствует артериальной гипертензии, но

Таблица 6. Корреляция между рСКФ (мл/мин/1,73 м²) и маркерами воспалительного процесса у больных СД1 и ХБП

Показатели	Без ХБП (группа 2)	Группа 3			
		1-я стадия ХБП (группа 3.1)	2-я стадия ХБП (группа 3.2)	3а стадия ХБП (группа 3.3)	3б стадия ХБП (группа 3.4)
IL1 β , пг/мл	$R = -0,576$ $p = 0,031$	$R = -0,992$ $p < 0,000$	$R = -0,922$ $p < 0,000$	$R = -0,956$ $p = 0,003$	$R = -0,916$ $p = 0,001$
TNF α , пг/мл	$R = 0,559$ $p = 0,038$	$R = -0,448$ $p = 0,002$	$R = -0,616$ $p = 0,019$	$R = -0,986$ $p < 0,000$	$R = -0,842$ $p = 0,009$
ЛИИ, у.е.	$R = -0,018$ $p = 0,951$	$R = -0,566$ $p < 0,000$	$R = -0,801$ $p < 0,000$	$R = -0,750$ $p = 0,003$	$R = -0,955$ $p < 0,000$
Нейтрофилы / лимфоциты	$R = -0,054$ $p = 0,854$	$R = -0,698$ $p = 0,045$	$R = -0,769$ $p = 0,028$	$R = -0,957$ $p < 0,000$	$R = -0,902$ $p = 0,035$
С-РБ, МЕ/л	$R = 0,581$ $p = 0,030$	$R = -0,951$ $p < 0,000$	$R = -0,911$ $p < 0,000$	$R = -0,945$ $p = 0,009$	$R = -0,849$ $p = 0,008$
ЦП, мг/л	$R = -0,413$ $p = 0,143$	$R = -0,927$ $p < 0,000$	$R = -0,964$ $p < 0,000$	$R = -0,846$ $p = 0,003$	$R = -0,854$ $p = 0,007$

Примечание: приведены значения коэффициента корреляции Спирмена (R).

и усиливает воспаление в почках за счет увеличения продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL6 и TNF α . Наконец, в ответ на повреждение клеток почек активируется местный иммунный ответ, когда лимфоциты, макрофаги и другие клетки проникают в ткань почек, секретируют воспалительные медиаторы, что усугубляет повреждение почек.

В ответ на синтез, секрецию и повышение уровня в крови провоспалительных медиаторов, включая продемонстрированные нами IL1 β , TNF α , происходит активация миелоидного ростка костного мозга с увеличением пролиферации и дифференцировки клеток-предшественниц, увеличением количества нейтрофилов, включая миелоциты и метамиелоциты, в периферической крови. Данный факт был зафиксирован нами в виде увеличения ЛИИ и индекса нейтрофилы/лимфоциты. Нейтрофилы — наиболее распространенная популяция лейкоцитов у людей, их дегрануляция, фагоцитоз, генерация активных форм кислорода и азота, высвобождение внеклеточных ловушек инициируют и пролонгируют воспалительный процесс, участвуют в патогенезе ишемии миокарда, сердечной недостаточности инсульта и других заболеваний [19]. Полагают, что количество и функциональная активность нейтрофилов связаны с хроническим воспалением, формированием микро- и макроальбуминурии при СД, а повышение количества в крови является ранним маркером, наряду с микроальбуминурией и рСКФ, поражения почек при СД, прогрессирования (ДБП), а также имеет нелинейную связь с риском смерти при ДБП [10, 20]. По данным других исследователей, количество циркулирующих в крови нейтрофилов положительно коррелирует с протеинурией при ДБП [21].

Отношение нейтрофилов к лимфоцитам в крови указывает на системное воспаление и связано с распространенностью ДБП и сердечно-сосудистых заболеваний, смертностью от всех причин при СД [22, 23]. Индекс нейтрофилы/лимфоциты рассматривают в качестве надежной метрики выраженности системного воспаления с учетом роли нейтрофилов как неспецифических участников воспаления (врожденного иммунитета) и лимфоцитов как регуляторов всех воспалительных реакций и участников адаптивного иммунитета [24]. Показана положительная связь между индексом нейтрофилы/лимфоциты и концентрацией в сыворотке IL1 β и С-РБ [25]. Результаты нескольких метаанализов клинических исследований показали более высокие значения индекса нейтрофилы/лимфоциты у пациентов с диабетической нефропатией по сравнению с больными с СД без поражения почек, а также перспективы применения этого индекса в стратификации и прогнозировании риска смертности от всех причин, сердечно-сосудистой смертности [21, 26, 27]. В то же время наличие ХБП также может вызывать хроническое воспаление, которое усугубляет повреждение органов и тканей, приводит к эскалации воспалительных реакций [8]. Однако все эти данные посвящены роли нейтрофилов у больных СД2. Отметим также, что по сравнению с другими воспалительными маркерами ЛИИ и индекс нейтрофилы/лимфоциты имеют преимущества с точки зрения доступности, экономичности и информативности. По нашим данным, они показали высокую обратную связь с рСКФ при ХБП 2-й стадии и очень высокую связь при ХБП 3а и 3б стадиях.

При повышении уровня провоспалительных цитокинов в крови в гепатоцитах запускается синтез реактантов

острой фазы (РОФ) воспаления, включая С-РБ и ЦП как представителей соответственно РОФ первого эшелона (концентрация в крови повышается в первые 6–12 ч с максимумом через 24 ч) и РОФ третьего эшелона (максимум концентрации через 48–72 ч) [28]. РОФ широко используют в клинической практике для мониторинга течения воспалительных заболеваний и контроля лечения. С-РБ представлен нативной пентамерной и мономерной формами с плейотропной активностью, кроме маркерной роли выраженности воспалительного процесса и фактора риска сердечно-сосудистых заболеваний (для фракции высокочувствительного С-РБ), непосредственно участвует в патогенезе диабетической нефропатии за счет нескольких механизмов. Представлены данные о роли С-РБ в регуляции активации комплемента за счет подавления аутофагии подоцитов и ингибирования сигнализации оси C3a/C3aR, что показано в клинических и экспериментальных условиях при поражении почек в условиях СД [29]. Кроме того, при СД С-РБ активирует сигнальные пути TGF β /SMAD и ядерного фактора κ B, которые участвуют в реализации воспаления в почках и нефросклероза при диабетической нефропатии за счет индукции синтеза IL1 β , TNF α , хемоаттрактантного белка моноцитов-1, TGF β 1 [27, 30]. При экспериментальном стрептозотоцин-индуцированном СД и клеточной линии человеческих нефроэпителиоцитов показано участие С-РБ в патогенезе диабетической нефропатии через взаимодействие с рецептором Fc γ RII на клетках почек, активацию сигнальных путей Wnt/ β -катенина, ERK1/2 и нарушение эпителиально-мезенхимальных взаимодействий [31]. С-РБ через NF- κ B и Smad3-зависимые механизмы может вызвать гибель клеток и прогрессирующий фиброз почек [32]. Экспериментально-индуцированный дефицит С-РБ ингибирует развитие диабетической нефропатии [29]. Уровень С-РБ в сыворотке ассоциирован с микрососудистыми осложнениями, включая поражение почек, при СД2 [33, 34]. С использованием двухступенчатой регрессивной модели у более 2000 больных СД2 с оценкой однонуклеотидных генетических полиморфизмов гена С-РБ на хромосоме 1 (1q21–q23) показана причинно-следственная связь высокого уровня С-РБ в сыворотке и возникновения диабетической нефропатии [35]. По мнению некоторых исследователей, индекс С-РБ/альбумин сыворотки является более информативным независимым предиктором формирования диабетической нефропатии при СД2 [36]. Кроме того, уровень С-РБ в сыворотке ассоциирован с отношением альбумин/креатинин в моче у больных СД2 [37].

Церулоплазмин не только отражает острое и хроническое воспаление в организме, но и является металлопротеином с антиоксидантными свойствами благодаря своей ферроксидазной активности, а в условиях окислительного стресса может действовать как прооксидант, участвуя в образовании АФК и окисленных ЛПНП; именно с последним фактом связывают его патогенетическую роль в формировании осложнений при СД. Показано, что при диабетической нефропатии у пациентов с СД2 и микроальбуминурией наблюдаются повышенные потери меди в составе ЦП с мочой, что приводит к снижению синтеза Cu, Zn-супероксиддисмутазы и формированию окислительного стресса [38]. Повышенный уровень ЦП зафиксирован при СД1 и СД2, в том числе в условиях диабетической нефропатии [39, 40]. ЦП рассматривают как перспективный чувствительный биомаркер при СД2, принимающий участие в формировании окислительного стресса, инсулинорезистентности, нарушений метаболизма

липидов при данной патологии [41]. Установлена роль сывороточного ЦП как независимого прогностического фактора при прогрессировании диабетической нефропатии у пациентов с СД2. Нами убедительно показано повышение концентрации ЦП в сыворотке у больных с ХБП в условиях СД1, прогрессирующее от 16% прироста по медиане при ХБП 1-й стадии от значений в группе здоровых людей до 73% прироста при ХБП 3б стадии. Доказана обратная высокая связь ЦП со стадией ХБП по показателю рСКФ. Определение концентрации ЦП в сыворотке не представлено широко в клинической практике, однако оно может быть полезно в качестве маркера диабетической нефропатии при многократном определении и нарастании в динамике, особенно в отсутствии альбуминурии.

Важно отметить, что хронический воспалительный процесс в почках приводит к повреждению мелких сосудов и клубочков, протеинурии и снижению фильтрационной способности почек. Кроме этого, хроническое воспаление сопровождается активацией фибробластов и продукцией компонентов экстрацеллюлярного матрикса, что вызывает интерстициальный фиброз и утрату почечных функций. Эти механизмы, а также механизмы инициации воспалительного процесса при СД и ХБП взаимосвязаны, усиливают друг друга, создавая порочные круги, приводят к прогрессированию диабетической нефропатии и утрате функции почек, необходимости заместительной терапии. Понимание патофизиологии воспаления при диабетической нефропатии открывает перспективы для разработки эффективных методов диагностики и лечения этого серьезного состояния. Проблема поиска чувствительных и специфичных биомаркеров диабетической нефропатии актуальна для практической медицины в отношении диагностики, контроля лечения и прогрессирования ХБП при СД [42]. Первостепенное значение имеют используемые в настоящее время клинические биомаркеры, такие как рСКФ, протеинурия, альбуминурия, — важнейшие предикторы прогрессирования заболеваний почек, сердечно-сосудистых осложнений и смертности у пациентов с диабетической нефропатией [43]. По результатам проведенного исследования, на роль перспективных биомаркеров инициации и прогрессирования

поражения почек у больных СД1 и начальными стадиями ХБП претендуют уровень в сыворотке IL1 β , TNF α , С-РБ и ЦП, ЛИИ, индекс нейтрофилы/лимфоциты.

ВЫВОДЫ

У больных СД1 и начальными стадиями ХБП в сыворотке повышается концентрация IL1 β , TNF α , С-РБ и ЦП, увеличиваются ЛИИ, индекс нейтрофилы/лимфоциты. Наиболее значимыми показателями воспалительной активности у пациентов с СД1 и начальными стадиями ХБП являются уровень IL1 β в сыворотке, соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, а также концентрация С-РБ и ЦП. Имеет смысл измерять их в динамике, при наличии компенсации диабета и отсутствии активных воспалительных процессов у пациента, начиная с ХБП 1-й стадии. Выраженность воспалительного процесса и острофазового ответа у больных с СД1 и начальными стадиями ХБП прогрессирует и максимальна при 3б стадии ХБП, когда наблюдалось увеличение концентрации в сыворотке IL1 β в 2,4 раза, концентрации TNF α — на 34%, концентрации С-РБ — в 33 раза, концентрации ЦП — на 73%, ЛИИ — в 8,4 раза, индекса нейтрофилы/лимфоциты — в 5 раз. Установлено, что у больных СД1 с начальными стадиями ХБП интегральный показатель функции почек — рСКФ — снижается по мере увеличения содержания в сыворотке воспалительных маркеров. Наибольшее количество связей и их сила обнаружены при 3а и 3б стадии ХБП у больных СД1, преимущественно между рСКФ и концентрацией в сыворотке IL1 β и С-РБ. Представленные результаты расширяют имеющиеся представления о роли воспалительного процесса и ответа острой фазы в патогенезе ХБП у больных СД1, являются предпосылкой для проведения дальнейших более масштабных по количеству пациентов и продолжительности исследований в различных регионах РФ с учетом возраста, пола, конституциональных особенностей, сопутствующей патологии, вида терапии и других факторов, а также модернизации диагностических и прогностических критериев, совершенствованию профилактических и терапевтических мероприятий у больных с СД1 и начальными стадиями ХБП.

Литература

1. Дедов И. И., Шестакова М. В., Викулова О. К., Железнякова А. В., Исаков М. А., Сазонова Д. В., и др. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010–2022 гг. Сахарный диабет. 2023; 26 (2): 104–23. DOI: 10.14341/DM13035.
2. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2022; 102 (5S): S1–S127. DOI: 10.1016/j.kint.2022.06.008.
3. Patidar K, Deng JH, Mitchell CS, Ford Versypt AN. Cross-Domain Text Mining of Pathophysiological Processes Associated with Diabetic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(8): 4503. DOI: 10.3390/ijms25084503.
4. Eckardt KU, Delgado C, Heerspink HJL, Pecoits-Filho R, Ricardo AC, Stengel B, et al. Trends and perspectives for improving quality of chronic kidney disease care: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 2023; 104 (5): 888–903. DOI: 10.1016/j.kint.2023.05.013.
5. Vyas DA, Eisenstein LG, Jones DS. Hidden in Plain Sight — Reconsidering the Use of Race Correction in Clinical Algorithms. *N Engl J Med.* 2020; 383 (9): 874–82. DOI: 10.1056/NEJMms2004740.
6. Fan X, Yang M, Lang Y, Lu S, Kong Z, Gao Y, et al. Mitochondrial metabolic reprogramming in diabetic kidney disease. *Cell Death Dis.* 2024; 15: 442. DOI:10.1038/s41419-024-06833-0.
7. Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019; 25 (12): 1822–32. DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0. PubMed PMID: 31806905.
8. Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Fernandez-Fernandez B, Mora-Fernández C, Marchant V, Donate-Correa J, et al. Targeting inflammation to treat diabetic kidney disease: The road to 2030. *Kidney Int.* 2023; 103: 282–96. DOI: 10.1016/j.kint.2022.10.030.
9. Varra FN, Varra M, Varra VK, Theodosios-Nobelos P. Molecular and pathophysiological relationship between obesity and chronic inflammation in the manifestation of metabolic dysfunctions and their inflammation-mediating treatment options (Review). *Mol Med Rep.* 2024; 29: 95. DOI: 10.3892/mmr.2024.13219.
10. Xie R, Bishai DM, Lui DTW, Lee PCH, Yap DYH. Higher circulating neutrophil counts is associated with increased risk of all-cause mortality and cardiovascular disease in patients with diabetic kidney disease. *Biomedicines.* 2024; 12(8): 1907. DOI:

- 10.3390/biomedicines12081907. PubMed PMID: 39200371.
11. Сахарный диабет 1 типа у взрослых: клинические рекомендации. Рубрикатор клинических рекомендаций [Электронный ресурс]. 2022 [дата доступа: 2024 октябрь 21]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/286_2.
 12. Хроническая болезнь почек (ХБП): клинические рекомендации. Рубрикатор клинических рекомендаций [Электронный ресурс]. 2021 [дата доступа: 2024 октябрь 21]. Режим доступа: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/469_2.
 13. Островский В. К., Машенко А. В., Янголенко Д. В. и др. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях. *Клин. лаб. диагностика*. 2006; 6: 50–3.
 14. Камышников В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. Минск: Изд-во «Интерпрессервис», 2003; 495 с.
 15. Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, van Bommel EJ, Heerspink HJ, van Raalte DH, Joles JA. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28(4): 1023–39. DOI: 10.1681/ASN.2016060666.
 16. Kanbay M, Copur S, Guldani M, Ozbek L, Hatipoglu A, Covic A, Mallamaci F, Zoccali C. Proximal tubule hypertrophy and hyperfunction: a novel pathophysiological feature in disease states. *Clin Kidney J*. 2024; 17(7): sfæ195. DOI: 10.1093/ckj/sfæ195.
 17. Jin L, Wang X, Liu Y, Xiang Q, Huang R. High levels of blood glycemic indicators are associated with chronic kidney disease prevalence in non-diabetic adults: Cross-sectional data from the national health and nutrition examination survey 2005–2016. *J Clin Transl Endocrinol*. 2024; 36: 100347. DOI: 10.1016/j.jcte.2024.100347.
 18. Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Opazo-Ríos L, Guerrero-Hue M, Garcia-Caballero C, Vazquez-Carballo C, et al. Pathogenic pathways and therapeutic approaches targeting inflammation in diabetic nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(11): 3798. DOI: 10.3390/ijms21113798.
 19. Shirakawa K, Sano M. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in cardiovascular disease: an overview and potential therapeutic approaches. *Biomedicines*. 2022; 10: 1850. DOI: 10.3390/biomedicines10081850.
 20. Zhang R, Chen J, Xiong Y, Wang L, Huang X, Sun T, et al. Increased neutrophil count is associated with the development of chronic kidney disease in patients with diabetes. *J Diabetes*. 2022; 14: 442–54. DOI: 10.1111/1753-0407.13292.
 21. Zeng G, Lin Y, Xie P, Lin J, He Y, Wei J. Relationship of the Neutrophil-Lymphocyte Ratio with All-Cause and Cardiovascular Mortality in Patients with Diabetic Kidney Disease: A Prospective Cohort Study of NHANES Study. *J Multidiscip Healthc*. 2024; 17: 2461–73. DOI: 10.2147/JMDH.S465317. PubMed PMID: 38799017.
 22. Wan H, Wang Y, Fang S, Chen Y, Zhang W, Xia F, et al. Associations between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and diabetic complications in adults with diabetes: a cross-sectional study. *J Diabetes Res*. 2020; 2020: 1–9. DOI: 10.1155/2020/6219545
 23. Gao JL, Shen J, Yang LP, Liu L, Zhao K, Pan XR, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio associated with renal function in type 2 diabetic patients. *World J Clin Cases*. 2024; 12(14): 2308–15. DOI: 10.12998/wjcc.v12.i14.2308. PubMed PMID: 38765748.
 24. Ko HL, Jung J, Lee J, Lim JH, Im DW, Kim YC, et al. Dynamic nature and prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in critically ill patients with acute kidney injury on continuous renal replacement therapy: A multicenter cohort study. *Front Med (Lausanne)*. 2023; 10: 1162381. DOI: 10.3389/fmed.2023.1162381.
 25. Karava V, Kondou A, Dotis J, Taparkou A, Farmaki E, Kollios K, et al. Exploring systemic inflammation in children with chronic kidney disease: correlates of interleukin 6. *Pediatr Nephrol*. 2024; 39: 1567–76. DOI: 10.1007/s00467-023-06234-z.
 26. Liu J, Liu X, Li Y, Qian J, Wei S, An S, et al. The association of neutrophil to lymphocyte ratio, mean platelet volume, and platelet distribution width with diabetic retinopathy and nephropathy: a meta-analysis. *Biosci Rep*. 2018; 38: 2–19. DOI: 10.1042/BSR20180172.
 27. Lau LFS, Ng JK, Fung WWS, Chan GCK, Mei-Shan Cheng, Chow KM, et al. Relationship between serial serum neutrophil-lymphocyte ratio, cardiovascular mortality, and all-cause mortality in Chinese peritoneal dialysis patients. *Kidney Blood Press Res*. 2023; 48(1): 414–23. DOI: 10.1159/000530554
 28. Messias BA, Botelho RV, Saad SS, Mochetti ER, Turke KC, Waisberg J. Serum C-reactive protein is a useful marker to exclude anastomotic leakage after colorectal surgery. *Sci Rep*. 2020; 10(1): 1687. DOI: 10.1038/s41598-020-58780-3.
 29. Zhang L, Li W, Gong M, Zhang Z, Xue X, Mao J et al. C-reactive protein inhibits C3a/C3aR-dependent podocyte autophagy in favor of diabetic kidney disease. *FASEB J*. 2022; 36(6): e22332. DOI: 10.1096/fj.202200198R. PubMed PMID: 35503088.
 30. Wang Y, Guo J, Shao B, Chen H, Lan H. The Role of TGF- β 1/SMAD in diabetic nephropathy: mechanisms and research development. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2023; 54(6): 1065–73. Chinese. DOI: 10.12182/20231160108. PubMed PMID: 38162063.
 31. Zhang L, Shen ZY, Wang K, Li W, Shi JM, Osoro EK, et al. C-reactive protein exacerbates epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin and ERK signaling in streptozocin-induced diabetic nephropathy. *FASEB J*. 2019; 33(5): 6551–63. DOI: 10.1096/fj.201801865RR. PubMed PMID: 30794428.
 32. Li J, Chen J, Lan HY, Tang Y. Role of C-Reactive protein in Kidney Diseases. *Kidney Dis (Basel)*. 2022; 9(2): 73–81. DOI: 10.1159/000528693. PubMed PMID: 37065607.
 33. Geng T, Zhu K, Lu Q, Wan Z, Chen X, Liu L, et al. Healthy lifestyle behaviors, mediating biomarkers, and risk of microvascular complications among individuals with type 2 diabetes: A cohort study. *PLoS Med*. 2023; 20(1): e1004135. DOI: 10.1371/journal.pmed.1004135. PubMed PMID: 36626356.
 34. Tang M, Cao H, Wei XH, Zhen Q, Liu F, Wang YF, et al. Association between high-sensitivity C-Reactive protein and Diabetic Kidney Disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 885516. DOI: 10.3389/fendo.2022.885516. PubMed PMID: 35784528.
 35. Lin CC, Li CI, Liu CS, Liao LN, Yang CW, Lin CH, et al. Association of high-sensitivity C-reactive protein and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes: a Mendelian randomization study. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2023; 11(1): e003197. DOI: 10.1136/bmjdr-2022-003197. PubMed PMID: 36828641.
 36. Aktas G. Serum C-reactive protein to albumin ratio as a reliable marker of diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. *Biomol Biomed*. 2024; 24(5): 1380–6. DOI: 10.17305/bb.2024.10426. PubMed PMID: 38635449.
 37. Kumari S, Singh B. Assessment of correlation of serum high-sensitive C-Reactive protein, urinary albumin-to-creatinine ratio, and lipid profile in diabetics. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021; 13(2): S1569–S1572. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_290_21. PubMed PMID: 35018031.
 38. Al-Bayati MA, Jamil DA, Al-Aubaidy HA. Cardiovascular effects of copper deficiency on activity of superoxide dismutase in diabetic nephropathy. *N Am J Med Sci*. 2015; 7(2): 41–6.
 39. Lee MJ, Jung CH, Kang YM, Jang JE, Leem J, Park JY, et al. Serum ceruloplasmin level as a predictor for the progression of diabetic nephropathy in Korean men with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab J*. 2015; 39(3): 230–9. DOI: 10.4093/dmj.2015.39.3.230. PubMed PMID: 26124993.
 40. de Paula Silva L, de Moraes Rego FG, Picheth G, Müller-Santos M, Alberton D. Prospection of plasma proteins as biomarkers for diabetes mellitus monitoring. *J Diabetes Metab Disord*. 2021; 20(1): 611–20. DOI: 10.1007/s40200-021-00788-1. PubMed PMID: 34222081.
 41. Wang S, Lu Z, Wang Y, Zhang T, He X. Metalloproteins and apolipoprotein C: candidate plasma biomarkers of T2DM screened by comparative proteomics and lipidomics in ZDF rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2020; 17: 66. DOI: 10.1186/s12986-020-00488-2. PubMed PMID: 32817751.
 42. Swaminathan SM, Rao IR, Shenoy SV, Prabhu AR, Mohan PB, Rangaswamy D, et al. Novel biomarkers for prognosticating diabetic kidney disease progression. *Int Urol Nephrol*. 2023; 55(4): 913–28. DOI: 10.1007/s11255-022-03354-7. PubMed PMID: 36271990.
 43. Jung CY, Yoo TH. Pathophysiologic Mechanisms and Potential Biomarkers in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes Metab J*. 2022; 46(2): 181–97. DOI: 10.4093/dmj.2021.0329.

References

- Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA, Sazonova DV, et al. Saharnyj diabet v Rossijskoj Federacii: dinamika jepidemiologičeskikh pokazatelej po dannym Federal'nogo registra sahnarnogo diabeta za period 2010–2022 gg. Saharnyj diabet. 2023; 26 (2): 104–23. DOI: 10.14341/DM13035. Russian.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2022; 102 (5S): S1–S127. DOI: 10.1016/j.kint.2022.06.008.
- Patidar K, Deng JH, Mitchell CS, Ford Versypt AN. Cross-Domain Text Mining of Pathophysiological Processes Associated with Diabetic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(8): 4503. DOI: 10.3390/ijms25084503.
- Eckardt KU, Delgado C, Heerspink HJL, Pecoits-Filho R, Ricardo AC, Stengel B, et al. Trends and perspectives for improving quality of chronic kidney disease care: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int.* 2023; 104 (5): 888–903. DOI: 10.1016/j.kint.2023.05.013.
- Vyas DA, Eisenstein LG, Jones DS. Hidden in Plain Sight — Reconsidering the Use of Race Correction in Clinical Algorithms. *N Engl J Med.* 2020; 383 (9): 874–82. DOI: 10.1056/NEJMs2004740.
- Fan X, Yang M, Lang Y, Lu S, Kong Z, Gao Y, et al. Mitochondrial metabolic reprogramming in diabetic kidney disease. *Cell Death Dis.* 2024; 15: 442. DOI:10.1038/s41419-024-06833-0.
- Furman D, Campisi J, Verdin E, Carrera-Bastos P, Targ S, Franceschi C et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019; 25 (12): 1822–32. DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0. PubMed PMID: 31806905.
- Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Fernandez-Fernandez B, Mora-Fernández C, Marchant V, Donate-Correa J, et al. Targeting inflammation to treat diabetic kidney disease: The road to 2030. *Kidney Int.* 2023; 103: 282–96. DOI: 10.1016/j.kint.2022.10.030.
- Varra FN, Varras M, Varra VK, Theodosios-Nobelos P. Molecular and pathophysiological relationship between obesity and chronic inflammation in the manifestation of metabolic dysfunctions and their inflammation-mediating treatment options (Review). *Mol Med Rep.* 2024; 29: 95. DOI: 10.3892/mmr.2024.13219.
- Xie R, Bishai DM, Lui DTW, Lee PCH, Yap DYH. Higher circulating neutrophil counts is associated with increased risk of all-cause mortality and cardiovascular disease in patients with diabetic kidney disease. *Biomedicines.* 2024; 12(8): 1907. DOI: 10.3390/biomedicines12081907. PubMed PMID: 39200371.
- Saharnyj diabet 1 tipa u vzroslyh: kliničeskie rekomendacii. Rubrikator kliničeskikh rekomendacij [Jelektronnyj resurs]. 2022 [data dostupa: 2024 oktjabr' 21]. Available from: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/286_2. Russian.
- Hroničeskaja bolezn' poček (HBP): kliničeskie rekomendacii. Rubrikator kliničeskikh rekomendacij [Jelektronnyj resurs]. 2021 [data dostupa: 2024 oktjabr' 21]. Available from: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/469_2. Russian.
- Ostrovskij VK, Mashhenko AV, Jangolenko DV i dr. Pokazateli krov'i i lejkocitarnogo indeksa intoksikacii v ocenke tjazhesti i opredelenii prognoza pri vospalitel'nyh, gnojnyh i gnojno-destruktyvnyh zabolevanijah. *Klin. lab. diagnostika.* 2006; 6: 50–3. Russian.
- Kamyshnikov VS. Kliniko-biohimičeskaja laboratornaja diagnostika. Minsk: Izd-vo «Interpresservis», 2003; 495 s. Russian.
- Tonneijck L, Muskiet MH, Smits MM, van Bommel EJ, Heerspink HJ, van Raalte DH, Joles JA. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28 (4): 1023–39. DOI: 10.1681/ASN.2016060666.
- Kanbay M, Copur S, Guldan M, Ozbek L, Hatipoglu A, Covic A, Mallamaci F, Zoccali C. Proximal tubule hypertrophy and hyperfunction: a novel pathophysiological feature in disease states. *Clin Kidney J.* 2024; 17 (7): sfae195. DOI: 10.1093/ckj/sfae195.
- Jin L, Wang X, Liu Y, Xiang Q, Huang R. High levels of blood glyceic indicators are associated with chronic kidney disease prevalence in non-diabetic adults: Cross-sectional data from the national health and nutrition examination survey 2005–2016. *J Clin Transl Endocrinol.* 2024; 36: 100347. DOI: 10.1016/j.jcte.2024.100347.
- Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Opazo-Ríos L, Guerrero-Hue M, Garcia-Caballero C, Vazquez-Caballo C, et al. Pathogenic pathways and therapeutic approaches targeting inflammation in diabetic nephropathy. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (11): 3798. DOI: 10.3390/ijms21113798.
- Shirakawa K, Sano M. Neutrophils and neutrophil extracellular traps in cardiovascular disease: an overview and potential therapeutic approaches. *Biomedicines.* 2022; 10: 1850. DOI: 10.3390/biomedicines10081850.
- Zhang R, Chen J, Xiong Y, Wang L, Huang X, Sun T, et al. Increased neutrophil count is associated with the development of chronic kidney disease in patients with diabetes. *J Diabetes.* 2022; 14: 442–54. DOI: 10.1111/1753-0407.13292.
- Zeng G, Lin Y, Xie P, Lin J, He Y, Wei J. Relationship of the Neutrophil-Lymphocyte Ratio with All-Cause and Cardiovascular Mortality in Patients with Diabetic Kidney Disease: A Prospective Cohort Study of NHANES Study. *J Multidiscip Healthc.* 2024; 17: 2461–73. DOI: 10.2147/JMDH.S465317. PubMed PMID: 38799017.
- Wan H, Wang Y, Fang S, Chen Y, Zhang W, Xia F, et al. Associations between the neutrophil-to-lymphocyte ratio and diabetic complications in adults with diabetes: a cross-sectional study. *J Diabetes Res.* 2020; 2020: 1–9. DOI: 10.1155/2020/6219545.
- Gao JL, Shen J, Yang LP, Liu L, Zhao K, Pan XR, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio associated with renal function in type 2 diabetic patients. *World J Clin Cases.* 2024; 12 (14): 2308–15. DOI: 10.12998/wjcc.v12.i14.2308. PubMed PMID: 38765748.
- Ko HL, Jung J, Lee J, Lim JH, Im DW, Kim YC, et al. Dynamic nature and prognostic value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in critically ill patients with acute kidney injury on continuous renal replacement therapy: A multicenter cohort study. *Front Med (Lausanne).* 2023; 10: 1162381. DOI: 10.3389/fmed.2023.1162381.
- Karava V, Kondou A, Dotis J, Taparkou A, Farmaki E, Kollios K, et al. Exploring systemic inflammation in children with chronic kidney disease: correlates of interleukin 6. *Pediatr Nephrol.* 2024; 39: 1567–76. DOI:10.1007/s00467-023-06234-z.
- Liu J, Liu X, Li Y, Quan J, Wei S, An S, et al. The association of neutrophil to lymphocyte ratio, mean platelet volume, and platelet distribution width with diabetic retinopathy and nephropathy: a meta-analysis. *Biosci Rep.* 2018; 38: 2–19. DOI: 10.1042/BSR20180172.
- Lau LFS, Ng JK, Fung WWS, Chan GCK, Mei-Shan Cheng, Chow KM, et al. Relationship between serial serum neutrophil-lymphocyte ratio, cardiovascular mortality, and all-cause mortality in Chinese peritoneal dialysis patients. *Kidney Blood Press Res.* 2023; 48 (1): 414–23. DOI: 10.1159/000530554.
- Messias BA, Botelho RV, Saad SS, Mocchetti ER, Turke KC, Waisberg J. Serum C-reactive protein is a useful marker to exclude anastomotic leakage after colorectal surgery. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 1687. DOI: 10.1038/s41598-020-58780-3.
- Zhang L, Li W, Gong M, Zhang Z, Xue X, Mao J et al. C-reactive protein inhibits C3a/C3aR-dependent podocyte autophagy in favor of diabetic kidney disease. *FASEB J.* 2022; 36(6): e22332. DOI: 10.1096/fj.202200198R. PubMed PMID: 35503088.
- Wang Y, Guo J, Shao B, Chen H, Lan H. The Role of TGF- β 1/SMAD in diabetic nephropathy: mechanisms and research development. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2023; 54 (6): 1065–73. Chinese. DOI: 10.12182/20231160108. PubMed PMID: 38162063.
- Zhang L, Shen ZY, Wang K, Li W, Shi JM, Osoro EK, et al. C-reactive protein exacerbates epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin and ERK signaling in streptozocin-induced diabetic nephropathy. *FASEB J.* 2019; 33 (5): 6551–63. DOI: 10.1096/fj.201801865RR. PubMed PMID: 30794428.
- Li J, Chen J, Lan HY, Tang Y. Role of C-Reactive protein in Kidney Diseases. *Kidney Dis (Basel).* 2022; 9 (2): 73–81. DOI: 10.1159/000528693. PubMed PMID: 37065607.
- Geng T, Zhu K, Lu Q, Wan Z, Chen X, Liu L, et al. Healthy lifestyle behaviors, mediating biomarkers, and risk of microvascular complications among individuals with type 2 diabetes: A cohort study. *PLoS Med.* 2023; 20 (1): e1004135. DOI: 10.1371/journal.pmed.1004135. PubMed PMID: 36626356.
- Tang M, Cao H, Wei XH, Zhen Q, Liu F, Wang YF, et al. Association between high-sensitivity C-Reactive protein

- and Diabetic Kidney Disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 885516. DOI: 10.3389/fendo.2022.885516. PubMed PMID: 35784528.
35. Lin CC, Li CI, Liu CS, Liao LN, Yang CW, Lin CH, et al. Association of high-sensitivity C-reactive protein and diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes: a Mendelian randomization study. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2023; 11 (1): e003197. DOI: 10.1136/bmjdr-2022-003197. PubMed PMID: 36828641.
 36. Aktas G. Serum C-reactive protein to albumin ratio as a reliable marker of diabetic neuropathy in type 2 diabetes mellitus. *Biomol Biomed*. 2024; 24 (5): 1380–6. DOI: 10.17305/bb.2024.10426. PubMed PMID: 38635449.
 37. Kumari S, Singh B. Assessment of correlation of serum high-sensitive C-Reactive protein, urinary albumin-to-creatinine ratio, and lipid profile in diabetics. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021; 13 (2): S1569–S1572. DOI: 10.4103/jpbs.jpbs_290_21. PubMed PMID: 35018031.
 38. Al-Bayati MA, Jamil DA, Al-Aubaidy HA. Cardiovascular effects of copper deficiency on activity of superoxide dismutase in diabetic nephropathy. *N Am J Med Sci*. 2015; 7(2): 41–6.
 39. Lee MJ, Jung CH, Kang YM, Jang JE, Leem J, Park JY, et al. Serum ceruloplasmin level as a predictor for the progression of diabetic nephropathy in Korean men with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab J*. 2015; 39 (3): 230–9. DOI: 10.4093/dmj.2015.39.3.230. PubMed PMID: 26124993.
 40. de Paula Silva L, de Moraes Rego FG, Picheth G, Müller-Santos M, Alberton D. Prospection of plasma proteins as biomarkers for diabetes mellitus monitoring. *J Diabetes Metab Disord*. 2021; 20 (1): 611–20. DOI: 10.1007/s40200-021-00788-1. PubMed PMID: 34222081.
 41. Wang S, Lu Z, Wang Y, Zhang T, He X. Metalloproteins and apolipoprotein C: candidate plasma biomarkers of T2DM screened by comparative proteomics and lipidomics in ZDF rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2020; 17: 66. DOI: 10.1186/s12986-020-00488-2. PubMed PMID: 32817751.
 42. Swaminathan SM, Rao IR, Shenoy SV, Prabhu AR, Mohan PB, Rangaswamy D, et al. Novel biomarkers for prognosticating diabetic kidney disease progression. *Int Urol Nephrol*. 2023; 55 (4): 913–28. DOI: 10.1007/s11255-022-03354-7. PubMed PMID: 36271990.
 43. Jung CY, Yoo TH. Pathophysiologic Mechanisms and Potential Biomarkers in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes Metab J*. 2022; 46 (2): 181–97. DOI: 10.4093/dmj.2021.0329.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО РАДИАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ПОТЕРЮ ТЕЛОМЕРНЫХ УЧАСТКОВ ХРОМОСОМ В Т-ЛИМФОЦИТАХ У ЖЕНЩИН

Я. В. Кривошапова 

Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, Россия

Более 60 лет назад жители прибрежных сел реки Теча были подвержены хроническому облучению в широком диапазоне доз. Предметом исследования были теломерные районы в метафазных хромосомах культивированных Т-лимфоцитов периферической крови. Целью исследования было оценить влияние хронического облучения на потери теломерных участков хромосом у облученных женщин Южного Урала с применением метода флуоресцентного окрашивания. Определяли хроматидные и хромосомные потери теломерных участков хромосом в трех дозовых подгруппах: группа сравнения (0–0,01 Гр), группа облучения дозой 0,2–0,9 Гр и группа облучения дозой 1–4,6 Гр. В выборке жителей Южного Урала женского пола, подвергшихся хроническому облучению в диапазоне поглощенных доз на ККМ от 0 до 4,6 Гр, было установлено, что хроматидные потери теломер для группы сравнения и группы облученных в дозе более 1 Гр статистически не различимы ($p > 0,33$), в то же время группа облученных средними дозами 0,2–0,9 Гр статистически отличается от них ($p < 0,05$). Для хромосомных потерь установлено статистически значимое различие между всеми группами ($p < 0,05$). Согласно полученным данным, теломерные потери присутствуют в 99,85% клеток доноров. Достоверно чаще во всех группах встречались потери теломерного участка на одной из хроматид. Таким образом, в группе с дозой 0,2–0,9 Гр среднее число потерь хроматид выше и статистически значимо отличается от других групп женского пола в исследуемом возрастном диапазоне.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, Т-лимфоциты, теломеры, хромосомы, потери теломер, флуоресцентная *in situ* гибридизация

Финансирование: государственное задание ФМБА РФ на выполнение прикладной научно-исследовательской работы по теме «Отдаленные цитогенетические эффекты хронического облучения у жителей Южного Урала».

Благодарности: автор выражает благодарность и. о. заведующей лаборатории радиационной генетики Ю. Р. Ахмадуллиной за ценные замечания.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 8 от 19 июня 2024 г.). У лиц, участвующих в цитогенетических исследованиях, было получено информированное согласие на забор образцов крови и на дальнейшее обследование. Все бланки и анкеты хранятся в лаборатории радиационной генетики УНПЦ РМ.

 **Для корреспонденции:** Яна Владимировна Кривошапова
ул. Воровского, д. 68А, г. Челябинск, 454141, Россия; Yana_ho@mail.ru

Статья получена: 16.10.2024 **Статья принята к печати:** 13.11.2024 **Опубликована онлайн:** 13.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.055

ESTIMATION OF THE IMPACT OF CHRONIC RADIATION EXPOSURE ON TELOMERE LOSS IN WOMEN'S T LYMPHOCYTES

Krivoschchapova IaV 

Urals Research Center for Radiation Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Chelyabinsk, Russia

Residents of the Techa Riverside villages were chronically exposed to the wide range of doses more than 60 years ago. Telomeric regions of metaphase chromosomes in the cultured peripheral blood T-lymphocytes were the subject of the research. The study aimed to assess the impact of chronic exposure on telomere loss in exposed women of the Southern Urals using a fluorescent staining method. Chromatid and chromosome telomere loss was determined in three dose subgroups: comparison group (0–0.01 Gy), group of exposed individuals with the dose of 0.2–0.9 Gy, and group of the exposed individuals with the dose of 1–4.6 Gy. In the sample of female residents of the Southern Urals chronically exposed in the range of absorbed doses to RBM of 0–4.6 Gy, it was shown that there were no differences in telomere loss between the comparison group and the group exposed to the dose exceeding 1 Gy ($p > 0.33$), while the group of individuals exposed to medium doses of 0.2–0.9 Gy was statistically significantly different ($p < 0.05$). Statistically significant differences between all groups were reported for chromosome telomere loss ($p < 0.05$). According to the data obtained, telomere loss was found in 99.85% of donor cells. The loss of telomere region on one of the chromatids occurred statistically significantly more often in all the groups. Thus, in the group exposed to the dose of 0.2–0.9 Gy, the average rate of chromatid telomere loss was higher, it was statistically significantly different from that of the other groups of females of the studied age.

Keywords: ionizing radiation, T-lymphocytes, telomere, chromosome, telomere loss, FISH

Funding: State Assignment of FMBA of Russia, R&D project “Long-term Cytogenetic Effects of Chronic Exposure in Residents of the Southern Urals.”

Acknowledgements: the author would like to express sincere gratitude to Yu.R. Akhmadullina, acting head of the Laboratory of Radiation Genetics, for valuable comments.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Urals Research Center for Radiation Medicine (protocol No. 8 dated 19 June 2024). Individuals, who were included into the cytogenetic study, gave the informed consent to blood sampling and further assessment. All forms and questionnaires are stored in the Laboratory of Radiation Genetics of the Urals Research Center for Radiation Medicine.

 **Correspondence should be addressed:** Yana V. Krivoschchapova
Vorovsky, 68A, Chelyabinsk, 454141, Russia; Yana_ho@mail.ru

Received: 16.10.2024 **Accepted:** 13.11.2024 **Published online:** 13.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.055

Ионизирующее излучение оказывает влияние на человеческую жизнь повсюду: медицинские диагностические процедуры, использование воздушного транспорта, действие природного ионизирующего излучения в местах

с повышенным фоновым уровнем радиации. Помимо спланированного и контролируемого воздействия излучения, существует также незапланированное воздействие в результате случайных аварийных ситуаций

с источниками ионизирующего излучения. Изучение механизмов влияния радиации на здоровье человека является важной и актуальной задачей.

Более 60 лет назад на Южном Урале более 100 тыс. человек подверглись кумулятивному хроническому облучению в широком диапазоне доз. Поступление радионуклидов $^{89,90}\text{Sr}$ с пищей и водой обусловило внутреннее облучение, а внешнее сформировалось от поверхности речной воды, куда осуществляли сбросы жидких радиоактивных отходов (γ -облучение). В результате длительного наблюдения за облученными на Южном Урале людьми были отмечены изменения в состоянии многих систем организма [1, 2].

Влияние ионизирующего излучения на процесс формирования хромосомных перестроек доказано многочисленными исследованиями. Структура ДНК в клетке нарушается из-за воздействия ионизирующего излучения с образованием соединений, способных повреждать ДНК. К таким соединениям относят, например, активные формы кислорода, продукты перекисного окисления липидов и др. В результате возникают разрывы межатомных связей в сахаро-фосфатном остове, что ведет к нарушению непрерывности молекулы ДНК. При отсутствии или при недостаточной репарации они могут стать иницирующим событием на пути к старению и онкогенезу [3, 4]. Разрывы бывают одноцепочечные (если разорвана одна цепь ДНК) и двухцепочечные (если разорваны обе цепи).

За поддержание стабильности хромосом и генома в клеточном ядре отвечают повторяющиеся нуклеотидные последовательности — теломеры. Изучение теломерных районов хромосом человека — актуальная научная задача в связи с доказанным участием теломер в таких процессах, как старение, онкотрансформация клеток. Ряд генетических заболеваний связан с изменениями в теломерных участках хромосом.

В проведенных ранее исследованиях теломерных районов хромосом с использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации FISH (от англ. fluorescence *in situ* hybridization) были выявлены качественные изменения хроматина у облученных лиц. Было отмечено, что внутри хромосомных плеч наблюдались теломерные сигналы, что является результатом инверсий с вовлечением теломерных районов [5]. Показано также статистически значимое снижение длины теломер у облученных лиц в некоторых хромосомных плечах по сравнению с необлученными [6]. Во время исследований обратил на себя внимание тот факт, что не все метафазные хромосомы в клетке имеют четыре теломеры на концевых участках, у части хромосом теломерный участок вообще не визуализируется.

Потеря теломерных участков может возникать как из-за постепенного укорочения теломер во время деления клеток, так и в результате стохастических событий, при которых теломерные повторяющиеся последовательности теряются, например, после терминальной делеции или двухцепочечного разрыва в субтеломерной области [7]. Некоторые исследования опухолевых клеточных линий показывают, что такие спонтанные делеции теломер характерны для раковых клеток [8, 9].

Для эволюции человека потеря теломерных участков имеет важное значение. Многие генетические заболевания возникают в результате изменений вблизи концов хромосом, например, умственная отсталость и мышечная дистрофия [10]. Кроме того, у женщин с бесплодием выявлена значительно более выраженная потеря теломер, чем у пациенток контрольной группы [11].

Влияние ионизирующего излучения также может стать причиной потери теломерных участков хромосом. Механизм этого действия остается обсуждаемым вопросом среди ученых и не имеет однозначного ответа. Из-за того что на долю теломер приходится всего 0,02% от генома человека, маловероятно прямое действие радиации, вследствие которого произойдут разрыв хроматиды и потеря теломерного участка. Анализ литературы дает основание полагать, что влияние активных форм кислорода может приводить к образованию модифицированных оснований и к разрывам отдельных цепей ДНК, в том числе в теломерных участках [12]. Богатые гуанином теломерные последовательности ДНК (-TTAGGG-) становятся мишенью для окислительного повреждения, ведь именно гуанин обладает самым низким окислительно-восстановительным потенциалом из всех азотистых оснований. Гуанин легко окисляется до 8-оксогуанина, который принято считать одним из основных биомаркеров окислительного стресса [13]. Одноцепочечные разрывы в G-богатых цепях плохо восстанавливаются и дольше сохраняются в теломерах [14]. Под действием ионизирующего излучения вблизи теломер могут возникать двухцепочечные разрывы, что может привести к хромосомным перестройкам. Это один из механизмов репликативного старения нормальных клеток человека, вызванного ионизирующим излучением. Клеточные изменения, влияющие на эффективность механизма репликации ДНК, могут способствовать остановке репликационных вилок в теломерах и потере теломер [15].

Существуют также исследования, в которых отмечается, что потери теломерного участка в хромосоме могут появиться в результате действия различных белков, например, TAZP (от англ. telomeric zinc finger associated protein) с одиннадцатью цинковыми пальцами, который способен специфически связываться с теломерами хромосом и обрезать их [16].

Применение FISH и локуспецифичных зондов позволяет выявлять изменения в теломерных участках хромосом. Потеря теломерных участков может затрагивать как одно плечо, так и оба (хромосомная потеря теломерных участков на сестринских хроматидах).

Цель пилотного исследования — оценить потери теломерных участков хромосом в лимфоцитах периферической крови с применением метода флуоресцентного окрашивания у женщин, облученных на реке Теча.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика обследованных лиц

Так как исследование потерь теломерного участка было пилотным и проводилось в ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России впервые, было принято решение ограничить группы по половому признаку, и на начальном этапе оценить исследуемый эффект только у групп женщин. Критерии включения: женщины, проживавшие на загрязненных радионуклидами территориях, 1939–1959 гг. рождения, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию в широком диапазоне доз: женщины из группы сравнения, которые аварийному облучению не подвергались.

Информация о выборке и состоянии здоровья облученных лиц была предоставлена отделом «База данных "Человек"». Индивидуализированные суммарные дозы от внешнего и внутреннего облучения (далее — дозы

Таблица 1. Характеристика обследованных женщин

Группа	Число доноров, <i>n</i>	Средний возраст, лет (диапазон)	Доза, Гр средняя
Группа 1 (сравнения) (0–0,01 Гр)	10	65,4 ± 3,3 (62–71)	0,003 ± 0,003
Группа 2 (облученные) (0,2–0,9 Гр)	10	74,5 ± 4,6 (69–81)	0,64 ± 0,21
Группа 3 (облученные) (1–4,6 Гр)	12	74 ± 2,6 (71–80)	1,7 ± 0,9
Все доноры (0–4,6 Гр)	32	71,4 ± 5,4 (62–81)	

облучения) на ККМ были рассчитаны по системе TRDS-2016 в биофизической лаборатории [17]. Данные о наличии онкопатологии в анамнезе обследуемых женщин были предоставлены эпидемиологической лабораторией ФГБУН УНПЦ РМ. Критерии исключения из исследования: наличие в анамнезе аутоиммунных, онкологических, хронических воспалительных заболеваний в фазе обострения; прием в анамнезе цитостатиков, антибиотиков, дата рождения после 1961 г.

Было обследовано 32 женщины. Группу сравнения (далее — группа 1) составили 10 человек, шесть из них имели дозу на ККМ от 0,0001 до 0,01 Гр, а четыре аварийному облучению не подвергались. 10 женщин подверглись хроническому радиационному воздействию в дозах 0,2–0,9 Гр (далее — группа 2), средняя доза 0,64 ± 0,21 Гр. В группу высокодозовых облученных (далее — группа 3) были включены 12 женщин с кумулятивной дозой на ККМ более 1 Гр, так как именно при высоких дозах наиболее часто проявляются цитогенетические эффекты [1]. Диапазон — 1,01–4,6 Гр, средняя доза — 1,7 ± 0,9 Гр (табл. 1).

Получение препаратов метафазных хромосом Т-лимфоцитов периферической крови

Цитогенетическое исследование проводили на метафазах Т-лимфоцитов периферической крови, стимулированных фитогемагглютинином (ФГА). Препараты хромосом получали по принятому в лаборатории протоколу: проводили культивирование клеток в течение 54 ч. За 3 ч вводили колцемид в итоговой концентрации 0,1 мг/мл. Гипотоническую обработку метафазных клеток проводили за 40–50 мин до фиксации теплым 37 °C раствором KCl (0,55%). Затем смесь центрифугировали. Далее проводили фиксацию метафазных пластинок (три части этанол медицинский, 95%: одна часть — ледяная уксусная кислота) и получение препаратов хромосом [18].

В процессе раскапывания клеточной суспензии на предметные стекла для получения лучшего результата стремились свести к минимуму чрезмерное распределение и наложение хромосом, чтобы каждая метафаза была пригодна для анализа. После раскапывания клеточной суспензии предметные стекла сушили на термоплате при температуре 42 °C, затем флуоресцентно окрашивали.

Методика окраски теломерных районов методом флуоресцентной *in situ* гибридизации с локуспецифичными зондами (FISH)

Использовали зонды набора Telomere FISH Kit/Cy3 (Dako, Дания). Окрашивали хромосомы в соответствии с протоколом производителя зондов. Зонд окрашивает только теломерные районы хромосом и не распознает

субтеломерные последовательности [19]. Для получения данного зонда производитель использует Су3-контюгированную пептидную нуклеиновую кислоту, которая является синтетическим аналогом ДНК, и связывается с ДНК хромосом по правилам спаривания оснований.

Анализ флуоресцентно окрашенных препаратов проводили на микроскопе Axio Imager Z2 (Zeiss, Германия), фильтры DAPI и SpO, ПО Isis. Для поиска и оцифровки метафазных пластинок система Metafer была настроена таким образом, чтобы автоматически получать изображения пяти кадров для канала SpO, каждый из которых будет отличаться по высоте друг от друга на полмикрона. После того как Metafer сделал пять кадров, в фоновом режиме автоматически из каждого кадра выбираются самые контрастные участки. В результате получается итоговая фотография, где все сигналы резкие и контрастные, что повышает точность результата анализа. Таким образом, возможности программы Isis позволяют достоверно установить отсутствие теломерного сигнала на любой хроматиде. Для этого оцифрованное изображение просматривается при использовании фильтров DAPI-SpO и при черно-белом инвертированном изображении интересующей хромосомы.

Потери теломерного участка в ходе анализа разделяли на два вида — хроматидные и хромосомные. Хроматидные потери определяли, если теломерный сигнал отсутствовал в одной из сестринских хроматид, а вторая не была изменена. На рис. 1 представлена пятая пара хромосом: в левой хромосоме визуализируются все четыре теломеры, в правой хромосоме видно, что один теломерный район q-плеча отсутствует. В случае отсутствия теломерных сигналов в двух сестринских хроматидах потерю считали хромосомной (рис. 2). Отсутствие двух сигналов на не парных хроматидах или на разных плечах одной хроматиды считали, как две хроматидные одиночные потери.

В анализ включали метафазы, содержащие 46 хромосом без наложений и артефактов. В каждой клетке анализировали все хромосомы. Считали 25–100 клеток для каждого донора. Данные о потере теломерных участков заносили в протокол анализа.

Статистическая обработка данных

Таким образом, исходными данными для статистического анализа стали результаты исследования 1560 клеток для 32 людей в возрасте 62–81 год, разделенные на три группы в соответствии с дозами облучения. Для каждой клетки просматривали все 46 хромосом и отмечали факт хроматидной или хромосомной потери теломерных участков для каждой из них. Анализ результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10 (StatSoft, США).



Рис. 1. Пример выявления потери теломерного участка в красно-синем фильтре и в инвертированном изображении. У хромосомы слева визуализируются все четыре теломеры. Справа представлен пример потери теломеры на одной из хроматид q-плеча

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходные данные, разделенные на дозовые группы, для обоих случаев потерь теломер (хроматидных и хромосомных) представлены на рис. 3. Изучаемое явление (потери теломерных участков для разных дозовых групп) не может быть представлено с помощью нормального распределения (рис. 4), поэтому для сравнения результатов наблюдений между группами использовали непараметрический критерий Манна–Уитни.

За нулевую гипотезу принимали отсутствие различий числа потерь теломер (хромосомных или хроматидных) в отдельных клетках между дозовыми группами. Было установлено, что хроматидные потери для группы сравнения (группа 1) и группы с высокими уровнями облучения (группа 3) статистически не различимы ($p > 0,33$), в то же время группа средних доз (группа 2) статистически отличается от них ($p < 0,05$). Для хромосомных потерь было установлено статистически значимое различие ($p < 0,05$) между всеми группами. Таким образом, можно сделать вывод, что во второй группе среднее число хроматидных потерь выше и статистически значимо отличается от других групп.

На рис. 5 представлены диаграммы размаха исходных данных для каждой из групп облучения (прямоугольниками отображены 5-й и 95-й перцентили, центральная точка — медиана, «усы» соответствуют максимальным и минимальным значениям), в табл. 2 — данные для каждой из исследуемых дозовых подгрупп для хроматидных потерь и хромосомных потерь: относительное содержание в клетках, медиана, перцентили 5%–95%, минимум и максимум.

Потеря хотя бы одного теломерного участка встречалась в 99,85% проанализированных клеток.

Во всех группах достоверно чаще встречались потери на одной из хроматид, чем хромосомная потеря ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одна из функций теломер — обеспечение стабильности хромосомы, поэтому понимание причин изменений в теломерных областях позволит пролить свет на механизмы развития онкопатологии, генетических заболеваний человека, бесплодия а также старения организма [20]. Воздействие ионизирующего излучения на клетки человека способно вызывать изменения на уровне хроматина, например, разрывы цепей ДНК, неправильное воссоединение которых может приводить к возникновению хромосомных перестроек. Эти события приводят к перераспределению гетерохроматина по плечам хромосом, могут влиять на распределение генов на хромосомах, изменять экспрессию генов, а значит, могут приводить к реализации различных биомедицинских эффектов, что в итоге скажется на здоровье человека [21].

Пилотный проект, представленный в настоящей статье, является частью исследования по изучению теломерных участков хромосом в лаборатории радиационной генетики УНПЦ РМ. Ранее были оценены такие показатели, как длина теломерных районов и частота инверсий с захватом теломерного участка для лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на реке Теча [5, 6]. В ходе настоящего исследования предметом исследования были потери теломерного участка в метафазных хромосомах культивированных Т-лимфоцитов периферической крови у облученных жителей Южного Урала. Для этих целей использовали метод флуоресцентной окраски теломерных районов хромосом. Был проведен анализ влияния

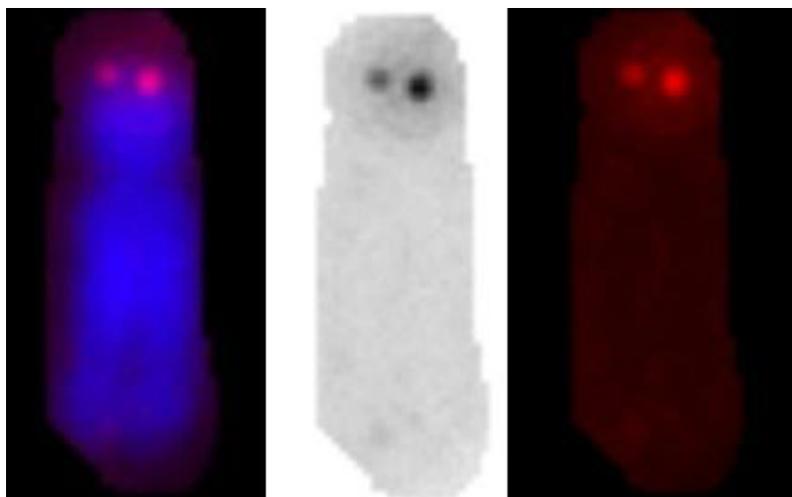


Рис. 2. Пример выявления хромосомной потери теломерного участка в красно-синем фильтре и в инвертированном изображении. Теломеры на обоих q-плечах не визуализируются

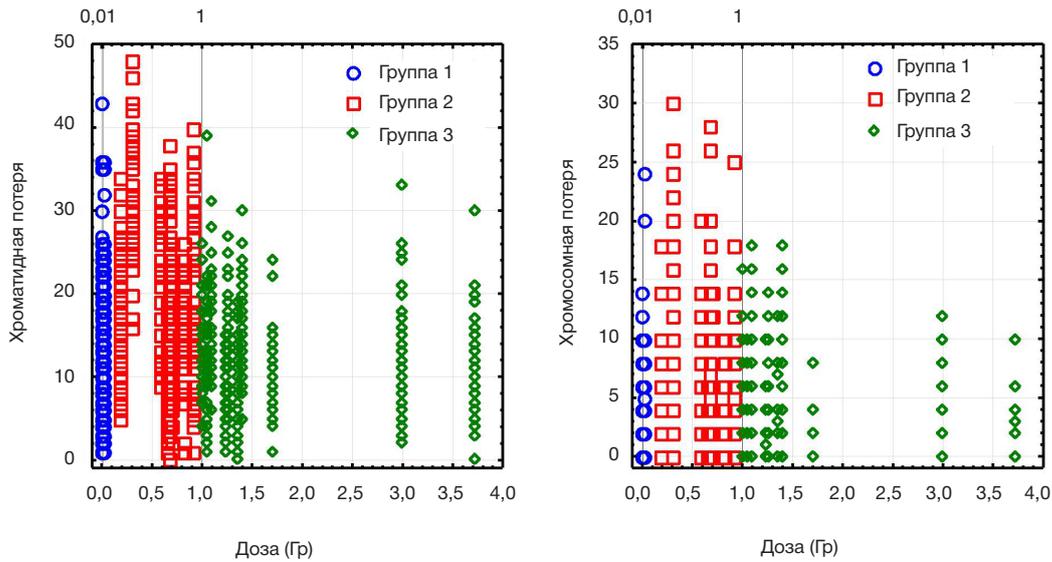


Рис. 3. Исходные данные, разделенные на дозовые группы

радиационного фактора на потери теломерных районов хромосом. Согласно полученным данным, теломерные потери присутствуют в 99,85% клеток доноров. Оказалось, что достоверно чаще во всех группах встречались потери теломерного участка на одной из хроматид. Потеря одной из сестринских теломер может возникать из-за дефектов репликации в S-стадии клеточного цикла, а хромосомная, скорее всего, в результате возникновения потери до синтетической стадии, когда хромосома представляет собой одну хроматиду, впоследствии удваивается в синтетической стадии (соответственно участок с потерей теломеры также удваивается и образуется хромосомная потеря) [22, 23]. Также низкие частоты хромосомных потерь, по сравнению с хроматидными, можно объяснить тем, что эти события реализуются с разной вероятностью. Хромосома занимает определенное пространство в ядре и в норме не пересекается с хроматином других

хромосом, поэтому наиболее частые изменения будут отмечаться в пределах одной хроматиды. Лишенные теломерных районов концы плеч сестринских хроматид могут являться маркером для гибели данной клетки. То есть клетка с большим количеством теломерных потерь будет элиминирована в ходе деления для сохранения целостности генома.

В результате нашего исследования было установлено, что потери одиночных хроматид для группы сравнения и группы с высокими уровнями облучения статистически не различимы ($p > 0,33$), тогда как группа средних доз статистически отличается от них ($p < 0,05$). Для хромосомных потерь было установлено статистически значимое различие ($p < 0,05$) между всеми дозовыми группами. Таким образом, можно сделать вывод, что во второй группе среднее число потерь теломерных участков выше и статистически значимо отличается от других групп.

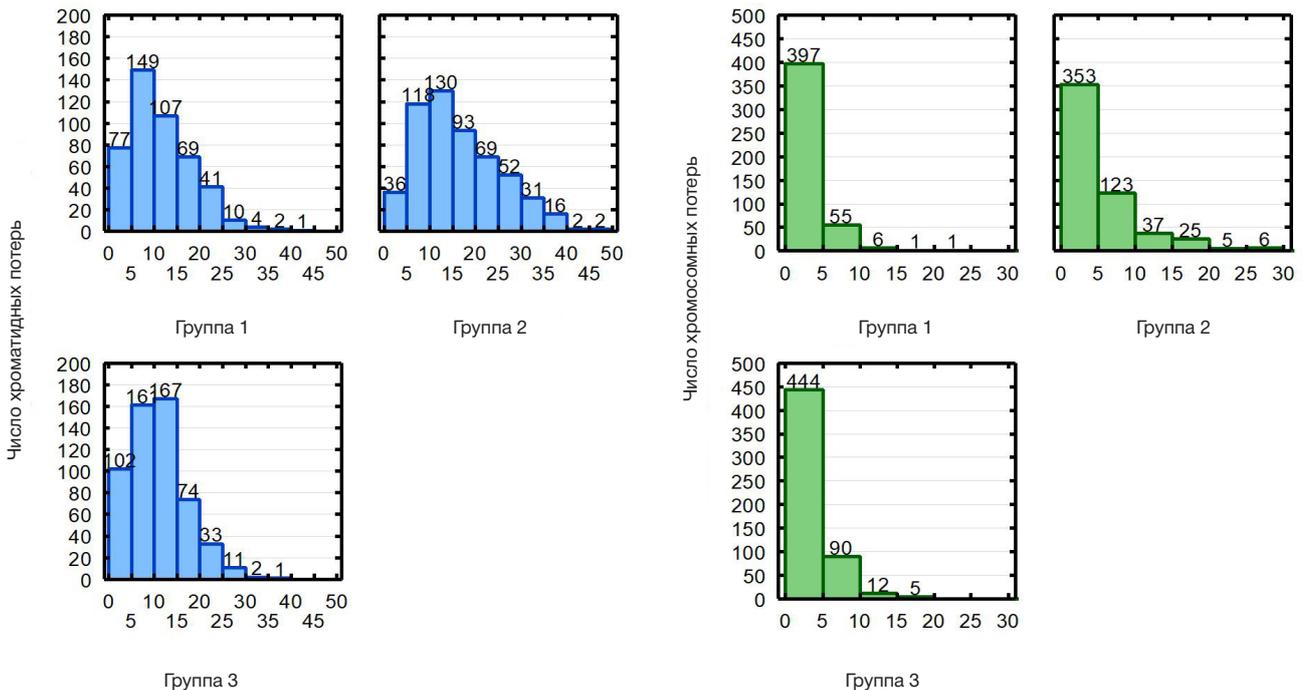


Рис. 4. Частота наблюдений хроматидных и хромосомных потерь в разных группах облучения

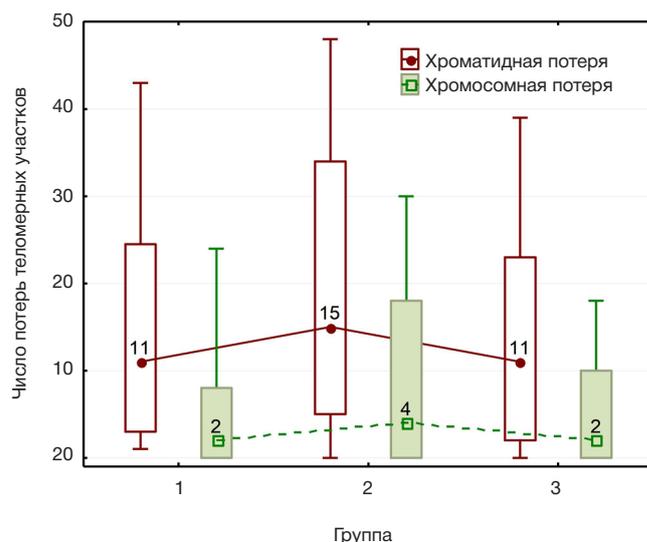


Рис. 5. Медианы, 5-й и 95-й процентиля, минимумы и максимумы исходных данных для разных групп облучения

Вопреки ожиданиям, в группе женщин, подвергшихся самым высоким уровням облучения, показатели потерь теломерных участков статистически не отличались от таковых у группы сравнения. При этом мы видим, что хроническое облучение все же оказывает влияние на количество теломерных потерь, судя по результатам, полученным для группы 2, где достоверно выше количество потерь хромосомных и хроматидных по сравнению с женщинами из группы сравнения того же возраста, проживавшими в сходных социально-экономических условиях, но не подвергавшихся действию хронического радиационного воздействия в дозах выше 0,01 Гр. Возможно, при достижении какого-то критического уровня в клетке происходит элиминация поврежденных хромосом, в результате чего показатели группы сравнения и группы доноров, облученных в дозах выше 1 Гр находятся на одном уровне и не имеют статистически значимых различий.

Такие «парадоксальные» данные на самом деле не противоречат результатам других цитогенетических исследований, где было выдвинуто предположение, что критерии отбора доноров для цитогенетических исследований могут способствовать выбору наиболее радиоустойчивых доноров среди облученных лиц, которые в пожилом возрасте не имеют ни аутоиммунных, ни онкологических заболеваний, не имеют сахарного диабета, а также не принимают препараты, которые могут оказать влияние на получаемые цитогенетические результаты. Косвенным подтверждением этому служат

исследования, в которых отмечалось, что у облученных лиц показатели частоты хромосомных aberrаций сравнивались с рассчитанными для необлученных доноров [24].

Таким образом, понимание механизмов, ответственных за чувствительность теломерных областей к влиянию внешних факторов, позволит по-новому взглянуть на причины генетических заболеваний человека, бесплодия, старения и развития онкопатологии. Дальнейшее изучение структуры хромосом цитогенетическими методами важно для понимания взаимодействия генов друг с другом. Требуется продолжение данной работы и расширение выборки для подтверждения полученных результатов, а также для оценки влияния нерадиационных факторов.

Выводы

В выборке жителей Южного Урала женского пола, подвергшихся сочетанному хроническому облучению в диапазоне поглощенных доз на ККМ от 0 до 4,6 Гр, было установлено, что хроматидные потери теломер для группы сравнения и группы с высокими уровнями облучения более 1 Гр статистически не различимы ($p > 0,33$), в то же время группа средних доз 0,2–0,9 Гр статистически отличается от них ($p < 0,05$). Для хромосомных потерь установлено статистически значимое различие между всеми дозовыми группами ($p < 0,05$). Таким образом, во второй группе среднее число потерь теломерных участков выше и статистически значимо отличается от других групп женского пола в исследуемом возрастном диапазоне.

Таблица 2. Медиана (5% и 95%) потерь теломерных районов в Т-клетках у женщин Южного Урала, подвергшихся облучению

Хроматидные потери						
Группа	Частота потери, %	Медиана	Минимум	Максимум	5%	95%
1	7	11	1	43	3	24,5
2	9	15	0	48	5	34
3	6	11	0	39	2	23
Хромосомные потери						
1	2	2	0	24	0	8
2	5	4	0	30	0	18
3	3	2	0	18	0	10

Литература

1. Аклев А. В., редактор. Последствия радиоактивного загрязнения реки Теча. Челябинск: Книга, 2016; 400 с.
2. Akhmadullina Y. The Composition of Micronuclei in T-Lymphocytes in Women Affected by Chronic Radiation Exposure. *Biology Bulletin*. 2023; 50: 2986–96.
3. Shim G, Ricoul M, Hempel WM, et al. Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2014; 760: 1–17.
4. Льюин Б. Ген. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011; 896 с.
5. Возилова А. В., Кривошапова Я. В. Исследование частоты инверсий и комплексных транслокаций в Т-лимфоцитах у облученных жителей Южного Урала. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2022; 62 (4): 408–15.
6. Кривошапова Я. В. Влияние хронического облучения на теломерные участки хромосом Т-лимфоцитов периферической крови человека. *Медицинская генетика*. 2022; 21 (11): 40–43.
7. Muraki K, Nyhan K, Han L, et al. Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front Oncol*. 2012; 2: 135.
8. Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 12683–8.
9. Nakamura AJ, Redon CE, Bonner WM. Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells. *Aging*. 2009; 1: 212–8.
10. Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 91–102.
11. M'kacher R, Colicchio B, Marquet V. Telomere aberrations, including telomere loss, doublets, and extreme shortening, are increased in patients with infertility. *Fertility and Sterility*. 2021; 115 (1): 164–73.
12. Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e110963. DOI: 10.1371/journal.pone.0110963. PMID: 25354277; PMCID: PMC4212976.
13. Мармий Н., Моргунова Г., Есипов Д., и др. 8-Оксо-2'-дезоксигуанозин: биомаркер клеточного старения и окислительного стресса или потенциальное лекарство против возрастных болезней? *Клиническая геронтология*. 2016; 22 (9–10): 46–47.
14. Petersen S, Saretzki G, Von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1998; 239: 152–60.
15. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem*. 2002; 27: 339–44.
16. Li JS, Miralles Fusté J, Simavorian T, et al. TZAP: A telomere-associated protein involved in telomere length control. *Science*. 2017; 10: 355 (6325): 638–41.
17. Shishkina EA, Napier BA, Preston DL, Degteva MO Dose estimates and their uncertainties for use in epidemiological studies of radiation-exposed populations in the Russian Southern Urals. *PLoS ONE*. 2023; 18 (8): e0288479. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288479>.
18. IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna, Austria: IAEA. 2011; 229.
19. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Sci*. 1991; 254 (5037): 1497–500.
20. Ахмадулина Ю. П., Возилова А. В., Кривошапова Я. В. Влияние хронического облучения на показатели цитогенетических маркеров старения у жителей прибрежных сел реки Теча. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2024; (2): 56–66. DOI: 10.47183/mes.2024.018.
21. Hoffmann AA, Rieseberg LH. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2008; 39: 21–42.
22. Eidelman YA, Salnikov IV, Stanina SV, Andreev SG. Chromosome folding promotes intrachromosomal aberrations under radiation- and nuclease-induced DNA breakage. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (22): 12186. DOI: 10.3390/ijms222212186.
23. Jullien L, Mestre M, Roux P, Gire V. Eroded human telomeres are more prone to remain uncapped and to trigger a G2 checkpoint response. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41 (2): 900–11.
24. Возилова А. В. Оценка влияния хронического облучения на преждевременное старение Т-лимфоцитов человека на основе нестабильных хромосомных аберраций. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2023; 2: 85–90. DOI: 10.47183/mes.2023.015.

References

1. Akleev AV, redaktor. Posledstviya radioaktivnogo zagrjaznenija reki Techa. Cheljabinsk: Kniga, 2016; 400 s. Russian.
2. Akhmadullina Y. The Composition of Micronuclei in T-Lymphocytes in Women Affected by Chronic Radiation Exposure. *Biology Bulletin*. 2023; 50: 2986–96.
3. Shim G, Ricoul M, Hempel WM, et al. Crosstalk between telomere maintenance and radiation effects: A key player in the process of radiation-induced carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2014; 760: 1–17.
4. Ljuin B. Geny. M.: BINOM. Laboratorija znaniy, 2011; 896 s. Russian.
5. Vozilova AV, Krivoshhapova JaV. Issledovanie chastoty inversij i kompleksnyh translokacij v T-limfocitah u obluchennyh zhitelej Juzhnogo Urala. *Radiacionnaja biologija. Radiojekologija*. 2022; 62 (4): 408–15. Russian.
6. Krivoshhapova JaV. Vlijanie hronicheskogo obluchenija na telomernye uchastki hromosom T-limfocitov perifericheskoj krvi cheloveka. *Medicinskaja genetika*. 2022; 21 (11): 40–43. Russian.
7. Muraki K, Nyhan K, Han L, et al. Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front Oncol*. 2012; 2: 135.
8. Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, et al. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 12683–8.
9. Nakamura AJ, Redon CE, Bonner WM. Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells. *Aging*. 2009; 1: 212–8.
10. Mefford HC, Trask BJ. The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat Rev Genet*. 2002; 3: 91–102.
11. M'kacher R, Colicchio B, Marquet V. Telomere aberrations, including telomere loss, doublets, and extreme shortening, are increased in patients with infertility. *Fertility and Sterility*. 2021; 115 (1): 164–73.
12. Coluzzi E, Colamartino M, Cozzi R, et al. Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e110963. DOI: 10.1371/journal.pone.0110963. PMID: 25354277; PMCID: PMC4212976.
13. Marmij N, Morgunova G, Esipov D, i dr. 8-Okso-2'-dezoksiguanozin: biomarker kletocznego starenija i oksilitel'nogo stressa ili potencial'noe lekarstvo protiv vozrastnyh boleznej? *Klinicheskaja gerontologija*. 2016; 22 (9–10): 46–47. Russian.
14. Petersen S, Saretzki G, Von Zglinicki T. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 1998; 239: 152–60.
15. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem*. 2002; 27: 339–44.
16. Li JS, Miralles Fusté J, Simavorian T, et al. TZAP: A telomere-associated protein involved in telomere length control. *Science*. 2017; 10: 355 (6325): 638–41.
17. Shishkina EA, Napier BA, Preston DL, Degteva MO Dose estimates and their uncertainties for use in epidemiological studies of radiation-exposed populations in the Russian Southern

- Urals. PLoS ONE. 2023; 18 (8): e0288479. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0288479>.
18. IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. Vienna, Austria: IAEA. 2011; 229.
 19. Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Sci*. 1991; 254 (5037): 1497–500.
 20. Akhmadullina YuR, Vozilova AV, Krivoshchapova YaV. The effect of chronic exposure on the parameters of cytogenetic markers of senescence in the residents of the Tëcha riverside settlements. *Extreme medicine*. 2024; (2): 53–63. DOI: 10.47183/mes.2024.018.
 21. Hoffmann AA, Rieseberg LH. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2008; 39: 21–42.
 22. Eidelman YA, Salnikov IV, Slanina SV, Andreev SG. Chromosome folding promotes intrachromosomal aberrations under radiation- and nuclease-induced DNA breakage. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (22): 12186. DOI: 10.3390/ijms222212186.
 23. Jullien L, Mestre M, Roux P, Gire V. Eroded human telomeres are more prone to remain uncapped and to trigger a G2 checkpoint response. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41 (2): 900–11.
 24. Vozilova AV. Assessment of the effect of chronic exposure on premature aging of human T-lymphocytes based on unstable chromosome aberrations. *Extreme medicine*. 2023; 2: 79–85. DOI: 10.47183/mes.2023.015.

АНАЛИЗ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МЕТОДА ОЦЕНКИ КРИВОЙ «ПОТОК–ОБЪЕМ» ПО ИЗМЕНЕНИЮ ЕЕ ФОРМЫ ПРИ ОБСТРУКЦИИ БРОНХОВ

Е. М. Десяцкова [✉], В. В. Греченко, В. В. Соболева

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

При обструкции бронхов кривая «поток–объем» имеет характерную вогнутую форму, однако данному признаку не уделяют должного внимания. Анализ скоростных показателей функции внешнего дыхания (ФВД), таких как пиковая объемная скорость выдоха (ПОС) и максимальные объемные скорости выдоха (МОС), позволит расширить диагностические возможности спирометрии. Цель работы — провести сравнительный анализ диагностической эффективности методов оценки кривой «поток–объем» по изменению ее формы на фоне обструктивных нарушений. Оценено 540 проб ФВД пациентов (234 мужчины 57 [36; 67] лет и 306 женщин 59 [44; 69] лет), для каждого определено процентное отношение площадей под фактической кривой и кривой предполагаемой нормы, рассчитан угол, образованный кривой, определено процентное отношение фактических МОС с предположительно нормальными, рассчитаны отрезные точки с целью разграничения обструктивных нарушений и нормы. Сформировано заключение о наличии или отсутствии у пациента обструкции бронхов. Результаты сравнивали с заключениями, полученными с помощью системы Knudson, с расчетом операционных характеристик теста относительно стандарта. Показано, что методы оценки угла β и общей вогнутости кривой обладают высокими значениями чувствительности (87,8% и 95,6% соответственно), а оценка площади под кривой «поток–объем» (AEX-FV) обладает высоким значением специфичности (88,6%). Таким образом, продемонстрирована достаточная диагностическая эффективность методов оценки кривой по изменению ее формы. Однако использование этих методов в отрыве от принятых систем расчета должных не видится целесообразным. Логичным представляется совместное использование системы расчета должных и одного из методов оценки кривой по форме.

Ключевые слова: спирометрия, ФВД, кривая «поток–объем»

Благодарности: коллектив авторов выражает благодарность Т. Д. Большаковой за помощь в подготовке научно-технического перевода настоящей статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Михайловна Десяцкова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; panielenadesat@gmail.com

Статья получена: 08.10.2024 **Статья принята к печати:** 10.11.2024 **Опубликована онлайн:** 27.11.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.051

ANALYSIS OF THE POSSIBILITIES OF THE FLOW-VOLUME CURVE ASSESSMENT BY THE CHANGES IN ITS SHAPE IN PATIENTS WITH OBSTRUCTIVE AIRWAY DISEASES

Desyatskova EM [✉], Grechenko VV, Soboleva VV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In case of obstructive disorders, the flow-volume curve has a concave shape, but this feature is not given due attention. The analysis of the velocity indicators of the respiratory function (such as the peak expiratory flow (PEF) and forced expiratory flows (FEFs)) will significantly expand the diagnostic capabilities of the spirometry method. This paper aims to perform a comparative analysis of the diagnostic strength of the methods of the flow-volume curve assessment by the changes in its shape in patients with obstructive airway diseases to determine the most reliable one. The respiratory function of 540 patients was tested (234 are men (57 [36; 67] years) and 306 are women (59 [44; 69] years)), with the ratio of areas under the actual curve and the predicted curve calculated for each one, as well as the angle formed by the curve; the ratio of the actual FEF (henceforth referred to as FEF) to the predicted FEF, cut-off points to differentiate between obstructive diseases and health. On the basis of these results, we concluded whether the patient's bronchi were blocked. The results were then compared to the Knudson reference equations, with the test's operational characteristics calculated compared to the standard. The methods of assessing the angle β and the total concavity of the flow-volume curve have high diagnostic sensitivity (87.8% and 95.6% respectively). The assessment of the area under the curve (AEX-FV) has high diagnostic specificity (88.6%). The results obtained show sufficient diagnostic efficiency of the methods of flow-volume curve estimation by the changes in its shape. However, the use of these methods in isolation from the reference equations does not currently seem reasonable for clinical practice. It appears reasonable to use the reference equations and one of the methods of curve shape assessment together.

Keywords: spirometry, respiratory function, flow-volume curve

Acknowledgements: the authors thank Tatiana D. Bolshakova for the help in translating this paper.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena M. Desyatskova
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; panielenadesat@gmail.com

Received: 08.10.2024 **Accepted:** 10.11.2024 **Published online:** 27.11.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.051

При вентиляционных нарушениях обструктивного типа кривая «поток–объем» имеет характерную вогнутую форму, направленную к оси абсцисс, причем интенсивность вогнутости коррелирует с выраженностью бронхообструктивных проявлений [1–3]. На практике изменение внешнего вида кривой зачастую не учитывают при расшифровке полученных результатов, а анализируют только процент отклонения фактических показателей функции внешнего дыхания (ФВД) пациента от должных [1]. Если подобную оценку все же проводят, то проводят

визуально, поскольку должных математических показателей для оценки вогнутости на сегодняшний день в клиническую практику еще не внедрено. Безусловно, оценка «на глаз» является очень субъективным диагностическим показателем, поскольку такой способ требует от врача определенного опыта и квалификации. К тому же в практике нередки случаи, когда даже при наличии упомянутой вогнутости кривой процент отклонения фактического показателя ФВД от должного превышает 100%, что свидетельствует об отсутствии у пациента каких-либо нарушений со стороны

дыхательной системы. И хотя анамнез жизни пациента в совокупности с характерным внешним видом кривой говорит об обратном, в заключении эти моменты не будут отражены, в результате чего сделать объективный вывод о состоянии пациента не представляется возможным.

Также следует отметить, что возможность постановки диагноза путем анализа лишь нескольких показателей ФВД (в частности, это процент снижения объема форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), процент снижения жизненной емкости легких (ЖЕЛ) и форсированной жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) и оценка индексов Тиффно или Генслера), с одной стороны, сокращает время расшифровки одного исследования, но с другой, искусственно сужает клинические возможности спирометрии. В рутинной практике зачастую не анализируются скоростные показатели ФВД, в то время как они отражают состояние бронхиального дерева по уровням [3] и могли бы дать более ясное понимание о состоянии пациента, не прибегая к использованию дорогостоящих и трудоемких диагностических процедур (например, рентгенографии органов грудной клетки или бронхоскопии).

Ранее уже предпринимались попытки сделать визуальную оценку кривой более объективной путем анализа дополнительных параметров, рассчитываемых на основе кривой «поток–объем». Так, в одном из обзоров авторы рассматривают несколько таких параметров, а именно оценку угла, образованного кривой, оценку отношения площадей (AEX-FV) и оценку степени отклонения фактических значений МОС от предполагаемых авторами должных [4]. Однако, несмотря на интерес научного сообщества к описанным методам [5–8], понимание их эффективности в клинической практике еще не сформировано окончательно. Поэтому целью настоящего исследования является сравнительный анализ диагностической эффективности методов оценки кривой «поток–объем» по изменению ее формы на фоне обструктивных вентиляционных нарушений для определения наиболее достоверного из них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для настоящего исследования был собран на базе научно-клинического центра № 2 РНХЦ им. Б. В. Петровского. Критерии включения в исследование: обращение в медицинскую организацию по причинам, относящимся к классам МКБ-10 J00–J99 («Болезни органов дыхания») и Z00–Z99 («Факторы, влияющие на состояние здоровья населения и обращения в учреждения здравоохранения»); согласие пациента на проведение диагностических манипуляций; спирометрическое исследование соответствует стандартам качества, утвержденным Европейским и Американским торакальным сообществами (стандарты ATS/ERS) [9], принятым Российским респираторным обществом [1]; возраст пациента старше 18 лет.

Таким образом, было отобрано 540 человек, из которых 234 (43,3%) мужчин и 306 (56,7%) женщин. Средний возраст мужчин составил 57 [36; 67] лет, женщин — 59 [44; 69] лет. Для понимания эффективности рассматриваемых методов среди пациентов разных возрастов выборка была разделена на 10-летние возрастные интервалы. В группу пациентов возраста «18–30 лет» вошло 76 пациентов, в группу «31–40 лет» — 50 пациентов, в группу «41–50 лет» — 57 пациентов, в группу «51–60 лет» — 109 пациентов, в группу «61–70 лет» —

134 пациента, в группу «71–80 лет» — 93 пациента, в группу «81–90 лет» — 21 пациент.

Для каждого пациента:

1) определено наличие или отсутствие обструкции бронхов (при помощи оценки индекса Тиффно или Генслера);

2) при наличии обструкции определена ее степень (по степени снижения ОФВ1 пациента относительно рассчитанной для него должной величины по системе Knudson);

3) определено процентное отношение площадей под фактической кривой «поток–объем» и кривой предполагаемой нормы;

4) рассчитан угол, образованный кривой;

5) определено процентное отношение фактических МОС и рассчитанных предположительно нормальных.

Результаты исследований ФВД сохраняли в ПО MS Excel (США). Фиксировали следующие данные пациента: пол и возраст; рост и вес; данные о результатах исследования спокойного дыхания (ЖЕЛ); данные о результатах исследования форсированного дыхания (форсированные объемные и скоростные показатели ФВД (в частности, форсированная ЖЕЛ, объем форсированного выдоха за первую секунду, пиковая объемная скорость (ПОС) выдоха, минутные объемные скорости (МОС) на уровне выдоха 25%, 50% и 75% от ФЖЕЛ), а также рассчитанные индексы Тиффно и Генслера).

Для определения функции, задающей нисходящую часть кривой «поток–объем», был использован метод интерполяции Лагранжа. Показано, что для кривой с узлами интерполяции в точках ПОС, МОС₂₅, МОС₅₀, МОС₇₅ и ФЖЕЛ интерполяционная функция будет иметь следующий вид:

$$P_n x = ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e, \quad (1)$$

где a , b , c , d , e — коэффициенты интерполяционного полинома, рассчитываемые для каждого пациента индивидуально.

Для расчета AEX-FV было использовано численное интегрирование определенной выше функции. Для приближенного вычисления определенного интеграла вида

$$\int_{\alpha}^{\beta} (ax^4 + bx^3 + cx^2 + dx + e) dx, \quad (2)$$

где α , β — границы определенного интеграла, был использован метод левых прямоугольников.

Для определения угла β использовали метод определения угла между векторами с расчетом скалярного произведения векторов и оценкой длины вектора в координатной форме. Векторами, углом между которыми рассматривается, в данном случае были приняты вектор a , определяемый как (МОС_x-проекция ПОС на ось ординат) и вектор b , равный (МОС_x-ФЖЕЛ) (рис. 1) [4], где в качестве МОС_x рассматривается МОС₅₀ или МОС₇₅. Для каждого пациента рассчитывали угол при МОС₅₀, однако в случаях, когда фактическая МОС₅₀ превышает предположительно нормальное значение указанного показателя, в качестве угла β рассматривали угол, центром которого является МОС₇₅.

Таким образом, формула для определения угла между векторами имеет следующий вид:

$$\cos(ab) = \frac{-\frac{1}{2}\text{ФЖЕЛ} \times (\text{ФЖЕЛ} - \frac{1}{2}\text{ФЖЕЛ}) - (\text{ПОС} - \text{МОС}_x) \times \text{МОС}_x}{\sqrt{(\frac{1}{2}\text{ФЖЕЛ})^2 + (\text{ПОС} - \text{МОС}_x)^2} \times \sqrt{(\text{ФЖЕЛ} - \frac{1}{2}\text{ФЖЕЛ})^2 + (\text{МОС}_x)^2}}, \quad (3)$$

где в качестве МОС_x рассматривается МОС₅₀ или МОС₇₅.

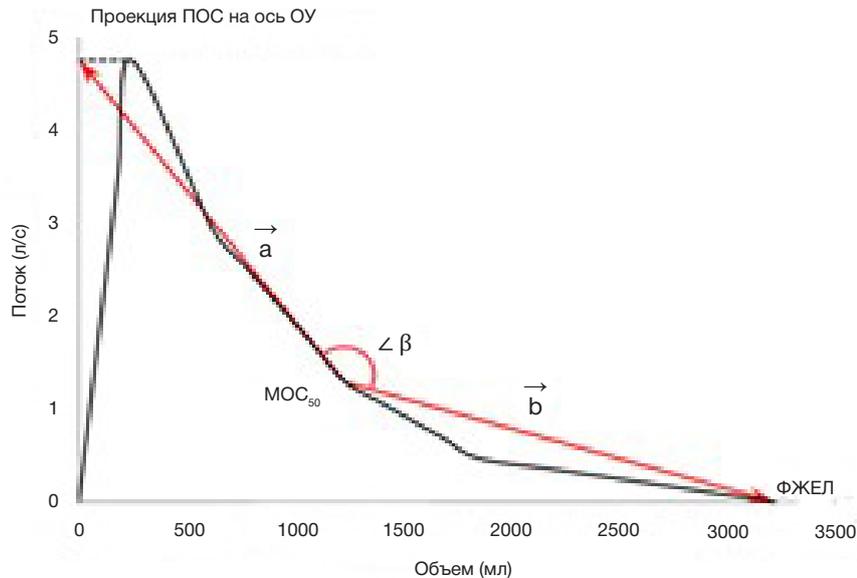


Рис. 1. Определение угла β (на примере угла при $МОС_{50}$)

Нормальные значения для скоростных показателей ФВД для метода оценки общей вогнутости определяли из уравнения прямой, соединяющей значения ПОС и ФЖЕЛ. В случаях, когда разница между ФЖЕЛ и ЖЕЛ составляет больше 200 мл, целесообразнее заменить значение ФЖЕЛ на ЖЕЛ и построить прямую, соединяющую точки ПОС и ЖЕЛ. Как и в предыдущем случае, предположительно нормальные скоростные показатели ФВД будут располагаться на этой прямой, однако в данном случае они будут определяться как $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ и $\frac{3}{4}$ от ФЖЕЛ (а не ЖЕЛ), поскольку в противном случае логика расчетов будет противоречить установленным Российским респираторным обществом определениям для $МОС_{25}$, $МОС_{50}$ и $МОС_{75}$ [1], согласно которым каждый из этих показателей равен указанному проценту от ФЖЕЛ (а не ЖЕЛ). Визуальное представление данного метода представлено на рис. 2.

В основу оценки показателей ФВД легла принятая система оценивания результатов спирометрии, а именно сравнение фактического значения с должным путем расчета процента отклонения от последнего [1, 2]. Подобная логика предусматривает дальнейшее сопоставление полученного отношения с референсными интервалами. Поскольку популяционная мощность нашего исследования недостаточна для определения интервалов сравнения, нами было принято решение о расчете отрезных точек для каждого метода оценки кривой «поток–объем» по форме, которые могли бы разделить наличие и отсутствие обструктивных нарушений. Для определения отрезных точек из основной выборки были отобраны пациенты ($n = 81$), которых в рамках настоящего исследования считали здоровыми — их индекс Тиффно был больше 70% [1, 2] и проведенная визуальная экспертная оценка врачом функциональной диагностики утверждала норму. Для полученной тестовой выборки были рассчитаны средние значения АЕХ-FV, угла β , а также процентов отклонения фактических МОС от предположительно нормальных. Данные значения приняты за отрезные точки. Для тех пациентов, чьи показатели были меньше отрезных точек, обструктивные нарушения считали подтвержденными.

Исследование ФВД методом спирометрии проводили на спирометре «СпироС-100» («АльтоМедика», Россия) [10]. Статистический анализ проводили путем расчета

абсолютных и относительных частот встречаемости признаков «обструкция» и «норма» для каждого из описанных методов оценки формы кривой «поток–объем» с дальнейшим расчетом операционных характеристик теста относительно стандарта (путем построения таблиц сопряженностей). Эталонном сравнения при расчете операционных характеристик считали результаты оценки операционных характеристик при расчете должных обусловлен отсутствием каких-либо ограничений, накладываемых на характеристики пациента (в отличие, например, от систем Клемента [11, 12], GLI [13] и ECCS [14]). Статистический анализ проводили в программных пакетах IBM SPSS Statistics for Windows v.27.0 (США) и MedCalc by MedCalc Software Ltd v.23.0.6 (Бельгия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

АЕХ-FV

Для каждого пациента из обучающей выборки была рассчитана площадь под фактической кривой «поток–объем» (АЕХ-FV) методом численного интегрирования. Площадь под кривой предполагаемой нормы определяли как площадь прямоугольного треугольника, равную половине произведения его катетов:

$$S (AEX Normal) = \frac{1}{2} \times ПОС_{\text{выдоха}} \times ФЖЕЛ. \quad (4)$$

Для формирования мнения о контрольной цифре процентного отношения АЕХ-FV и АЕХ-Normal, которая позволит однозначно разделить норму и обструкцию дыхательных путей, было рассчитано среднее значение для отношения АЕХ-FV и АЕХ-Normal (табл. 1). С учетом близких значений отрезных точек для всех возрастных групп, кроме пациентов старше 70 лет, в качестве единой отрезной точки для этих возрастных диапазонов взято значение отношения площадей, равное 85% (рассчитано как среднее значение между значениями отрезных точек для рассматриваемых возрастных диапазонов). Получено, что при использовании метода оценки АЕХ-FV состояние «норма» встречалось в 38,1% случаев (206 пациентов), а «обструкция» — в 61,9%, (334 пациента), в то время как

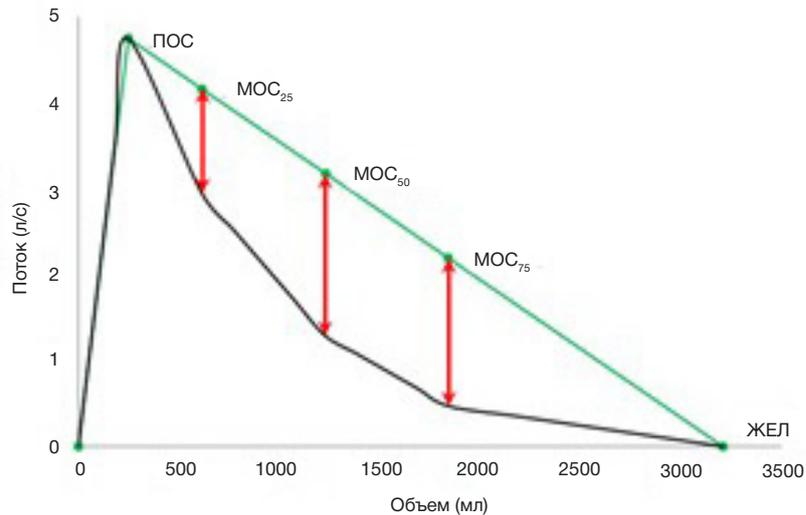


Рис. 2. Определение степени отклонения фактических значений MOC от предполагаемых должных (на примере случая, когда разница между ЖЕЛ и ФЖЕЛ составила более 200 мл)

при использовании системы расчета должных по Knudson норма встречалась в 31,1% случаев (168 пациентов), а обструкция — в 68,9% (372 пациента).

Угол β

Предварительно проведенный расчет среднего значения угла показал, что даже при определенных нормальных значениях угла на фоне диагностического заключения, зафиксированного в истории болезни пациента, утверждающего норму, отмечается характерная для обструктивного типа вентиляционных нарушений вогнутость кривой «поток–объем», направленная к оси объема. Это вызвано снижением показателя MOC_{75} , которое ранее не учитывалось в исследованиях, посвященных данному вопросу [7, 8]. Поэтому было дополнительно определено среднее значение угла, центром которого является MOC_{75} , при условии, что фактическая MOC_{50} превышает предположительно нормальное значение указанного показателя. Результаты расчета отрезных точек, позволяющих однозначно разделить норму и проявления обструктивных нарушений, представлены в табл. 2. При использовании метода оценки угла β состояние «норма» встречалось в 26,9% случаев (145 пациентов), а «обструкция» — в 73,1%, (395 пациентов), в то время как при использовании системы расчета должных по Knudson норма встречалась в 31,1% случаев (168 пациентов), а обструкция — в 68,9% (372 пациента).

Оценка общей вогнутости

По аналогии с принятой в практике логикой формирования заключения для каждого пациента были рассчитаны

предположительно нормальные значения максимальных объемных скоростей на уровне 25%, 50% и 75% от ФЖЕЛ и определено процентное отклонение фактических значений этих показателей с рассчитанными «должными». При расчете предположительно нормальных значений использовали следующее уравнение прямой, проходящей через две заданные точки:

$$\frac{x-x_1}{x_2-x_1} = \frac{y-y_1}{y_2-y_1} \quad (5)$$

Таким образом, для определения MOC заданного уровня было использовано уравнение:

$$MOC_y = \frac{(MOC_x - ПОС)_x \times (ФЖЕЛ_y - ПОС_y)}{ФЖЕЛ_x - ПОС_x} + ПОС_y \quad (6)$$

где x и y — координаты точки на соответствующих координатных осях. Следует отметить: в случае, когда фактическое значение MOC пациента превышало рассчитанное «должное», за норму принимали фактическое значение, а их отношения, соответственно, определяли как 100%. Такое допущение не противоречит Методическим рекомендациями о проведении метода спирометрии [1], поскольку утвержденный алгоритм оценки показателей спирометрии допускает существование значения процентного отношения фактического и должного значения больше 100%. В данном случае, если значение превышает эту отметку, то оно принимается за 100% и считается нормой.

Подобным образом проанализирована вся выборка, на основании чего определены отрезные точки для каждого рассматриваемого возрастного диапазона (табл. 3). При использовании метода оценки общей вогнутости состояние

Таблица 1. Отрезные точки для оценки AEX-FV, рассчитанные по рассматриваемым возрастным диапазонам

Возрастной интервал	Среднее значение отношения площадей, %	Отрезная точка, %
18–30 лет	91,7 ± 5,9	86
31–40 лет	91,6 ± 5,1	87
41–50 лет	91,7 ± 2,7	89
51–60 лет	88,9 ± 3,6	85
61–70 лет	90,5 ± 4,5	86
71–90 лет	82,2 ± 7,8	74

Примечание: средние значения отношения площадей представлены в виде (среднее ± стандартное отклонение), значения отрезных точек представлены с учетом округления до целого.

Таблица 2. Отрезные точки для угла β , рассчитанные по рассматриваемым возрастным диапазонам

Возрастной интервал	$\angle\beta$ при MOC_{50} , °	Отрезная точка для $\angle\beta$ при MOC_{50} , °	$\angle\beta$ при MOC_{75} , °	Отрезная точка для $\angle\beta$ при MOC_{75} , °
18–30 лет	166,9 ± 8,9	158	162,3 ± 6,9	155
31–40 лет	170,5 ± 8,7	162	157,5 ± 8,5	149
41–50 лет	170,0 ± 8,7	161	155,8 ± 7,4	148
51–60 лет	169,7 ± 11,5	158	152,7 ± 5,8	147
61–70 лет	169,5 ± 6,4	163	148,2 ± 6,8	141
71–90 лет	171,6 ± 9,4	162	148,2 ± 6,4	142

Примечание: средние значения углов представлены в виде (среднее ± стандартное отклонение), значения отрезных точек представлены с учетом округления до целого.

«норма» встречалось в 18,5% случаев (100 пациентов), а «обструкция» — в 81,5%, (440 пациентов), в то время как при использовании системы расчета должных по Knudson норма встречалась в 31,1% случаев (168 пациентов), а обструкция — в 68,9% (372 пациента). Метод оценки общей вогнутости чаще определяет обструктивные нарушения по сравнению с системой расчета должных Knudson (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метод расчета AEX-FV в целом обладает достаточно сбалансированными операционными характеристиками. Максимальная чувствительность теста зафиксирована в группе пациентов 61–70 лет (0,916), минимальная — в группе пациентов 71–80 лет, достигая 0,674. Что касается специфичности, то в этом случае максимального информативного значения данный показатель достигает в группе 18–30 лет (0,933), а минимального информативного значения — в группе пациентов 61–70 лет (0,800). В силу того, что для пациентов пожилого возраста наблюдается постепенное ослабление дыхательных мышц, которое при спирометрическом исследовании диагностируется как обструктивные нарушения определенной степени, «треугольник нормы» у пожилых пациентов почти не встречается. Таким образом, у пациентов пожилого возраста наблюдается характерный разброс между AEX-FV и AEX-Normal, который является естественным. С учетом подобной возрастной особенности скрининг дыхательных патологий в данном возрастном диапазоне несколько затруднителен. Полученные результаты также можно объяснить структурой анализируемой выборки пациентов. В выборку, рассматриваемую в настоящем исследовании, были включены преимущественно пациенты с подтвержденными дыхательными патологиями, в то время как для оценки скрининговой мощности теста требуется значительная выборка данных ФВД здоровых пациентов. В таком случае целесообразно повышение разнородности выборки, однако в силу ограниченности

исследовательской мощности настоящей работы это не представлялось возможным.

Метод определения угла β , образованного кривой «поток–объем», демонстрирует достаточно высокую для всех рассматриваемых возрастов диагностическую чувствительность. Это свидетельствует о значительном потенциале данного метода как диагностического. Его дополнительным преимуществом является оценка нарушений по уровням, в отличие, например, от рассмотренного ранее метода оценки AEX-FV, который оценивает состояние бронхиального дерева в целом. Что касается специфичности, то если для «AEX-FV» ее значения были информативны во всех возрастных группах (кроме лиц пожилого и старческого возраста), то в случае с углом β данный показатель в большинстве возрастных групп не является информативным. Как и в случае с методом оценки AEX-FV подобный результат может быть объяснен структурой анализируемых данных и численным превосходством больных пациентов над здоровыми.

Что касается оценки общей вогнутости кривой «поток–объем», то чувствительность данного метода, как и чувствительность метода оценки угла β , стабильно высока для всех возрастных групп. Это говорит о значительном качестве диагностических заключений, сформированных с учетом метода определения общей вогнутости. Показатель специфичности, как и для метода оценки угла, является неинформативным во всех рассматриваемых группах.

Таким образом, все рассматриваемые методы оценки кривой «поток–объем» по изменению ее формы в силу своих высоких диагностических мощностей могут быть рассмотрены в качестве уточняющих параметров в сомнительных клинических случаях. Для повышения качества скрининговых мероприятий для болезней органов дыхания, проводимых с помощью спирометрии, в качестве уточняющего критерия для пациентов младше 70 лет можно рассматривать определение отношения площадей под фактической кривой и кривой предполагаемой нормы, т. е. метод «AEX-FV».

Таблица 3. Отрезные точки для максимальных объемных скоростей на уровне выдоха определенного процента ФЖЕЛ, рассчитанные по рассматриваемым возрастным диапазонам

Возрастной интервал	MOC_{25}	MOC_{50}	MOC_{75}
18–30 лет	0,00 [0,00; 1,61]	0,00 [0,00; 1,36]	0,00 [0,00; 2,75]
31–40 лет	0,00 [0,00; 4,69]	0,00 [0,00; 11,84]	0,39 [0,00; 13,07]
41–50 лет	1,51 [0,00; 7,74]	1,79 [0,00; 5,22]	10,66 [0,00; 21,19]
51–60 лет	0,00 [0,00; 6,71]	0,05 [0,00; 12,36]	13,21 [1,98; 20,34]
61–70 лет	0,50 [0,00; 5,35]	0,00 [0,00; 5,67]	23,53 [13,96; 36,71]
71–90 лет	0,00 [0,00; 3,48]	4,86 [0,00; 14,09]	26,55 [11,08; 32,28]

Примечание: значения отрезных точек представлены в виде $Me [Q_1; Q_3]$.

Таблица 4. Результаты оценки диагностической эффективности методов оценки кривой «поток–объем» по изменению формы по основным рассматриваемым возрастным диапазонам

ЗС	Диагностическое заключение, зафиксированное в истории болезни пациента		
СД	АЕХ-FV	Угол β	Общая вогнутость
18–30 лет			
$n = 76$			
Ч	0,824, 95% ДИ (0,792; 0,831)	0,880, 95% ДИ (0,711; 0,967)	1,000, 95% ДИ (0,857; 1,000)
С	0,933, 95% ДИ (0,682; 0,997)	0,706, 95% ДИ (0,623; 0,749)	0,529, 95% ДИ (0,459; 0,529)
31–40 лет			
$n = 50$			
Ч	0,679, 95% ДИ (0,544; 0,755)	0,821, 95% ДИ (0,685; 0,917)	0,929, 95% ДИ (0,801; 0,987)
С	0,864, 95% ДИ (0,692; 0,961)	0,727, 95% ДИ (0,554; 0,848)	0,636, 95% ДИ (0,474; 0,711)
41–50 лет			
$n = 57$			
Ч	0,694, 95% ДИ (0,586; 0,754)	0,833, 95% ДИ (0,725; 0,916)	0,917, 95% ДИ (0,818; 0,976)
С	0,857, 95% ДИ (0,671; 0,960)	0,619, 95% ДИ (0,434; 0,761)	0,476, 95% ДИ (0,307; 0,579)
51–60 лет			
$n = 109$			
Ч	0,805, 95% ДИ (0,751; 0,832)	0,854, 95% ДИ (0,797; 0,899)	0,890, 95% ДИ (0,836; 0,935)
С	0,889, 95% ДИ (0,726; 0,970)	0,667, 95% ДИ (0,495; 0,805)	0,556, 95% ДИ (0,390; 0,693)
61–70 лет			
$n = 134$			
Ч	0,916, 95% ДИ (0,884; 0,934)	0,899, 95% ДИ (0,867; 0,923)	0,975, 95% ДИ (0,946; 0,992)
С	0,800, 95% ДИ (0,546; 0,944)	0,667, 95% ДИ (0,412; 0,860)	0,667, 95% ДИ (0,435; 0,806)
71–80 лет			
$n = 93$			
Ч	0,674, 95% ДИ (0,640; 0,685)	0,930, 95% ДИ (0,899; 0,949)	0,965, 95% ДИ (0,941; 0,988)
С	0,857, 95% ДИ (0,434; 0,992)	0,714, 95% ДИ (0,325; 0,946)	0,429, 95% ДИ (0,128; 0,714)
81–90 лет			
$n = 21$			
Ч	0,789, 95% ДИ (0,706; 0,789)	0,947, 95% ДИ (0,865; 0,947)	1,000, 95% ДИ (0,950; 1,000)
С	1,000, 95% ДИ (0,209; 1,000)	1,000, 95% ДИ (0,218; 1,000)	0,500, 95% ДИ (0,028; 0,500)

Примечание: ЗС — золотой стандарт, СД — система должных, Ч — диагностическая чувствительность, С — диагностическая специфичность.

Оправданным кажется опасение, что логика оценивания, заложенная в рассматриваемые методы, может привести к большому, по сравнению с классической методикой, числу ложноположительных результатов. Однако, по нашему мнению, под ложноположительным результатом в контексте принятого Российским респираторным обществом метода [1] будет пониматься скрытая обструкция, которая прямо не выявляется при помощи систем расчета должных, индексов Тиффно или Генслера или новых параметров оценки показателей ФВД (в частности, таких как нижняя граница нормы (LLN) [15–17] и z-оценка [1, 2, 15]). По нашему мнению, в данном случае повышенная настороженность к обструктивным вентиляционным нарушениям методов оценки кривой «поток–объем» по изменению ее формы оправдана, поскольку скрытая обструкция является доклинической стадией хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и впоследствии может спровоцировать дыхательную недостаточность [18].

Выводы

На сегодняшний день доля заболеваний органов дыхания в общемировой структуре смертности остается значительной. Так, третьей по частоте причиной смерти в

мире является ХОБЛ — заболевание с ярко выраженным обструктивным синдромом. Для диагностики патологий подобного рода можно использовать различные методы, однако самый простой и доступный — метод спирометрии с регистрацией петли «поток–объем». Основной спирометрии является сравнение полученных показателей ФВД пациента с рассчитанными по определенной системе должными значениями. Подобный подход достаточно давно используют в клинической практике и не раз подвергали критике. Целесообразно рассмотрение новых показателей или методов, с помощью которых возможно уточнение заключений, сделанных на основе кривой «поток–объем». Проведенное в рамках настоящей работы исследование диагностической эффективности методов оценки кривой «поток–объем» по изменению ее формы на фоне вентиляционных нарушений обструктивного типа позволяет рассматривать их как весьма точные методы диагностики обструктивных процессов в бронхах (в частности, методы оценки угла β и оценки общей вогнутости, которые обладают средними значениями чувствительности 87,8% и 95,6% соответственно). Оценка АЕХ-FV, напротив, обладает высоким средним значением специфичности (88,6%), что позволяет говорить об этом методе как более ориентированном на профилактический

скрининг дыхательных нарушений обструктивного типа. Однако неправильным было бы рассматривать эти методы изолированно от систем расчета должных. По нашему мнению, использование описанных методов в отрыве от принятых систем расчета должных значений на сегодняшний день не является целесообразным для клинической практики.

Более логичным видится их совместное использование для взаимного повышения диагностических возможностей. Именно совместное использование, по нашему мнению, потенциально может иметь наибольшую эффективность для практической медицины. Таким образом определяется вектор будущих исследований в данной проблемной области.

Литература

1. Методические руководства по использованию метода спирометрии. Российское респираторное общество, Российская ассоциация специалистов функциональной диагностики, Российское научное медицинское общество терапевтов. М., 2023; 64 с.
2. Стручков П. В., Дроздов Д. В., Лукина О. Ф. Спирометрия: руководство для врачей. М., 2023; 112 с.
3. Трисветова Е. Л., Федорович С. Е. Функциональные методы исследования внешнего дыхания: учеб.-метод. пособие. Минск: БГМУ, 2016; 28 с.
4. Maritano Furcada J, Rodríguez CI, Wainstein EJ, Benito HJ. Graphical Analysis Methods in Obstructive Spirometry: Does a Picture Speak More Than a Thousand Words? Arch Bronconeumol (Engl Ed). 2019; 55 (5): 272–4.
5. Ioachimescu OC, Stoller JK. Area under the expiratory flow-volume curve (AEX): actual versus approximated values. J Investig Med. 2020; 68 (2): 403–11.
6. Ioachimescu OC, McCarthy K, Stoller JK. Area under the expiratory flow-volume curve: normative values in the National Health and Nutrition Survey (NHANES) study. J Investig Med. 2022; 70 (5): 1247–57.
7. Kapp MC, Schachter EN, Beck GJ, et al. The shape of the maximum expiratory flow volume curve. Chest. 1988; 94 (4): 799–806.
8. Zhang Y, Xiong X, Dai F, et al. Curvilinearity of a maximum expiratory Flow-Volume curve: a useful indicator for assessing airway obstruction in children with asthma. Respir Care. 2020; 65 (4): 427–36.
9. Stanojevic S, Kaminsky DA, Miller M, et al. ERS/ATS technical standard on interpretive strategies for routine lung function tests. Eur Respir J. 2021; 60 (1): 2101499.
10. АЛТОМЕДИКА. Доступно по ссылке: <http://www.altomedika.ru>.
11. Клемент Р. Ф., Зильбер Н. А. Функционально-диагностические исследования в пульмонологии: Методические рекомендации. СПб., 1993; 47 с.
12. Клемент Р. Ф., Лаврушин А. А., Тер-Погасян П. А., Котегов Ю. М. Инструкция по применению формул и таблиц должных величин основных спирографических показателей. Л., 1986.
13. Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, et al. Standardization of spirometry 2019. Update an official American Thoracic Society and European Respiratory Society technical statement. Am J Respir Crit Care Med. 2019; 200 (8): 70–88.
14. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, et al. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardisation of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. Eur Respir J. 1993; 6 (16): 5–40.
15. Каменева М. Ю. Спирометрия: как оценить результаты? Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2022; 83: 91–99.
16. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests. Eur Respir J. 2005; 26 (5): 948–68.
17. Stanojevic S, Wade A, Stocks J, et al. Reference ranges for spirometry across all ages: a new approach. Am J Respir Crit Care Med. 2008; 177: 253–60.
18. Sukhovskii VS, Strelis AK, Grigor'ev EG, Sukhovskaia VV. Probl Tuberk Bolezn Legk. 2008; 7: 39–43.

References

1. Metodicheskie rukovodstva po ispol'zovaniyu metoda spirometrii. Rossijskoe respiratornoe obshhestvo, Rossijskaja asociacija specialistov funkcional'noj diagnostiki, Rossijskoe nauchnoe medicinskoe obshhestvo terapevtov. M., 2023; 64 s. Russian.
2. Struchkov PV, Drozdov DV, Lukina OF. Spirometrija: rukovodstvo dlja vrachej. M., 2023; 112 s. Russian.
3. Trisvetova EL, Fedorovich SE. Funkcional'nye metody issledovanija vneshnego dyhanija: ucheb.-metod. posobie. Minsk: BGMU, 2016; 28 s. Russian.
4. Maritano Furcada J, Rodríguez CI, Wainstein EJ, Benito HJ. Graphical Analysis Methods in Obstructive Spirometry: Does a Picture Speak More Than a Thousand Words? Arch Bronconeumol (Engl Ed). 2019; 55 (5): 272–4.
5. Ioachimescu OC, Stoller JK. Area under the expiratory flow-volume curve (AEX): actual versus approximated values. J Investig Med. 2020; 68 (2): 403–11.
6. Ioachimescu OC, McCarthy K, Stoller JK. Area under the expiratory flow-volume curve: normative values in the National Health and Nutrition Survey (NHANES) study. J Investig Med. 2022; 70 (5): 1247–57.
7. Kapp MC, Schachter EN, Beck GJ, et al. The shape of the maximum expiratory flow volume curve. Chest. 1988; 94 (4): 799–806.
8. Zhang Y, Xiong X, Dai F, et al. Curvilinearity of a maximum expiratory Flow-Volume curve: a useful indicator for assessing airway obstruction in children with asthma. Respir Care. 2020; 65 (4): 427–36.
9. Stanojevic S, Kaminsky DA, Miller M, et al. ERS/ATS technical standard on interpretive strategies for routine lung function tests. Eur Respir J. 2021; 60 (1): 2101499.
10. ALTOMEDIKA. Dostupno po ssylke: <http://www.altomedika.ru>.
11. Klement RF, Zilber NA. Funkcional'no-diagnosticheskie issledovanija v pul'monologii: Metodicheskie rekomendacii. SPb., 1993; 47 s. Russian.
12. Klement RF, Lavrushin AA, Ter-Pogasjan PA, Kotegov Yu. M. Instrukcija po primeneniju formul i tablic dolzhnyh velichin osnovnyh spirograficheskikh pokazatelej. L., 1986. Russian.
13. Graham BL, Steenbruggen I, Miller MR, et al. Standardization of spirometry 2019. Update an official American Thoracic Society and European Respiratory Society technical statement. Am J Respir Crit Care Med. 2019; 200 (8): 70–88.
14. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, et al. Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardisation of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. Eur Respir J. 1993; 6 (16): 5–40.
15. Kameneva MYu. Spirometrija: kak ocenit' rezul'taty? Bjul'teten' fiziologii i patologii dyhanija. 2022; 83: 91–99. Russian.
16. Pellegrino R, Viegi G, Brusasco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests. Eur Respir J. 2005; 26 (5): 948–68.
17. Stanojevic S, Wade A, Stocks J, et al. Reference ranges for spirometry across all ages: a new approach. Am J Respir Crit Care Med. 2008; 177: 253–60.
18. Sukhovskii VS, Strelis AK, Grigor'ev EG, Sukhovskaia VV. Probl Tuberk Bolezn Legk. 2008; 7: 39–43.