

# 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](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

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

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2023: 0,8

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h<sup>2</sup>) журнала по оценке Google Scholar: 10

**Scopus**<sup>®</sup>

WEB OF SCIENCE™

**Google**  
scholar

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

**SJR**  
Scimago Journal & Country Rank



ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)

**CYBERLENINKA**

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2025-02

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

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

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



Подписано в печать 30.04.2025

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

# BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

## BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

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

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

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

**TECHNICAL EDITOR** Evgeny Lukyanov

**TRANSLATORS** Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

**DESIGN AND LAYOUT** Marina Doronina

### EDITORIAL BOARD

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

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

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

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2023: 0,8



Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5



Five-year h-index is 10



SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14



Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive



Issue DOI: 10.24075/brsmu.2025-02

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

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

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



Approved for print 30.04.2025  
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>4</b>
Оценка пролиферативной активности и метаболизма глюкозы в клетках мукоэпидермоидной карциномы слюнных желез при различных системах градации Д. Р. Фамилья Фриас, З. Ю. Висайтова, Ю. О. Тигаи, А. А. Ивина, И. И. Бабиченко Assessing proliferative activity and glucose metabolism in cells of salivary gland mucoepidermoid carcinoma using different grading systems Familia Frias DR, Visaitova ZYu, Tigay YuO, Ivina AA, Babichenko II	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>11</b>
Экспрессия PD-1 в иммунных клетках микроокружения опухоли у пациентов с немелкоклеточным и мелкоклеточным раком легкого А. Ю. Калинин, Е. А. Царенкова, Д. М. Лоос, А. А. Мох, Е. О. Родионов, С. В. Миллер, Е. С. Григорьева, Л. А. Таширева PD1 Expression in Immune Cells within the Tumor Microenvironment of Patients with Non-Small Cell and Small Cell Lung Cancer Kalinchuk AYu, Tsarenkova EA, Loos DM, Mokh AA, Rodionov EO, Miller SV, Grigoryeva ES, Tashireva LA	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>17</b>
Характеристика метастаз-ассоциированных циркулирующих клеток при раке молочной железы: особенности параметров бокового светорассеяния А. В. Бузенкова, Е. С. Григорьева, В. В. Алифанов, Л. А. Таширева, О. Е. Савельева, Е. С. Пудова, М. В. Завьялова, Н. В. Чердынцева, В. М. Перельмутер Characteristics of the metastasis-associated circulating cells: features of side scatter parameters Buzenkova AV, Grigoryeva ES, Alifanov VV, Tashireva LA, Savelieva OE, Pudova ES, Zavyalova MV, Cherdyntseva NV, Perelmuter VM	
<b>МНЕНИЕ</b>	<b>26</b>
Современные модели визуализации опухолей у грызунов: возможности и перспективы в трансляционной медицине А. А. Фадеева, З. М. Осипова, Т. В. Чегурных, Н. М. Мышкина Modern tumor imaging models for rodents: potential and prospects in translational medicine Fadeeva AA, Osipova ZM, Chepurnykh TV, Myshkina NM	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>31</b>
Определение частоты носительства аутоантител у пациентов с целиакией методами моно- и мультиплексного иммуноанализа Н. Ф. Нуралиева, М. Ю. Юкина, С. В. Быкова, Е. Н. Савватеева, Л. В. Никанкина, Е. В. Кулагина, Б. Л. Шаскольский, Д. А. Грядун, Е. А. Трошина Determination of the rate of autoantibody carrier state in patients with celiac disease by mono- and multiplex immunoassay Nuralieva NF, Yukina MYu, Bykova SV, Savvateeva EN, Nikankina LV, Kulagina EV, Shaskolskiy BL, Gryadunov DA, Troshina EA	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>41</b>
Сравнение эффективности экстракорпорального фотофереза и глатирамера ацетата в лечении рассеянного склероза А. В. Кильдюшевский, С. В. Котов, О. П. Сидорова, А. В. Бородин, М. С. Бунак Comparison of extracorporeal photopheresis and glatiramer acetate efficacy in the treatment of multiple sclerosis Kildyushevsky AV, Kotov SV, Sidorova OP, Borodin AV, Bunak MS	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>48</b>
Морфологическая характеристика субхондральной костной ткани при остеоартрозе коленного сустава Б. Ш. Минасов, Р. Р. Якупов, В. Н. Акбашев, В. С. Шчекин, А. О. Власова, Т. Б. Минасов, К. К. Каримов, А. А. Ахмельдинова Morphological subchondral bone tissue characteristics in knee osteoarthritis Minasov BSh, Yakupov RR, Akbashaev VN, Shchekin VS, Vlasova AO, Minasov TB, Karimov KK, Akhmeldinova AA	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>55</b>
Прогностическая ценность экспресс-теста на прокальцитонин при гнойно-воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области В. А. Бельченко, И. В. Чантырь, К. Д. Загороднев, Ю. И. Пахомова Prognostic value of procalcitonin rapid test in purulent inflammatory diseases of the maxillofacial region Belchenko VA, Chantyr IV, Zavgorodnev KD, Pakhomova Yul	
<b>ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ</b>	<b>64</b>
Диагностический потенциал программно-аппаратного комплекса анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста В. Б. Никишина, Е. А. Петраш, А. С. Чаусов, К. К. Каниметов Diagnostic potential of the software-hardware complex for analysis of self-identification phenomenon in early childhood Nikishina VB, Petrash EA, Chausov AS, Kanimetov KK	
<b>МЕТОД</b>	<b>72</b>
Сравнительный анализ биохимических маркеров клеточных органелл сперматозоида человека при помощи конфокальной рамановской спектроскопии Р. В. Назаренко, А. В. Иржак, Б. Р. Гвасалия, Д. Ю. Пушкарь Comparative analysis of the human sperm cell organelle biochemical markers by confocal raman spectroscopy Nazarenko RV, Irzhak AV, Gvasalia BR, Pushkar DYU	
<b>МНЕНИЕ</b>	<b>78</b>
Терапевтические стратегии для лечения болезни Вильсона–Коновалова: современное состояние и перспективы А. В. Иваненко, В. Д. Стародубова, А. Г. Шохина Therapeutic strategies for Wilson's disease: current state and prospects Ivanenko AV, Starodubova VD, Shokhina AG	
<b>КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ</b>	<b>81</b>
Двухэтапная AAV8-генотерапия ребенка с синдромом Криглера–Найяра 1-го типа Д. В. Ребриков, А. В. Дегтярёва, Ю. Г. Янушевич, М. С. Готьё, Т. В. Городничева, А. С. Бавыкин, Л. В. Ушакова, Е. А. Филиппова, Д. Н. Дегтярёв, Г. Т. Сухих Two-step AAV8 gene delivery in a child with Crigler-Najjar syndrome type I Denis Rebrikov, Anna Degtyareva, Yuri Yanushevich, Marina Gautier, Tatyana Gorodnicheva, Andrey Bavykin, Lyubov Ushakova, Elena Filippova, Dmitriy Degtyarev, Gennadiy Sukhikh	

## ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ В КЛЕТКАХ МУКОЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ ГРАДАЦИИ

Д. Р. Фамилья Фриас<sup>1</sup>✉, З. Ю. Висайтова<sup>2</sup>, Ю. О. Тигай<sup>1</sup>, А. А. Ивина<sup>1</sup>, И. И. Бабиченко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, Москва, Россия

Мукоэпидермоидная карцинома (МЭК) является наиболее распространенной злокачественной опухолью слюнных желез и состоит из трех основных гистологических компонентов: мукоцитов, промежуточных и эпидермоидных клеток. Различные системы градации (AFIP, Brandwein, Modified Healy, MSKCC) сложны в применении. Маркеры Ki-67 и GLUT1, связанные с агрессивностью опухоли, могут улучшить диагностику и классификацию МЭК. Целью исследования было провести оценку корреляции пролиферативной активности и метаболизма глюкозы клеток с системами градации МЭК. Были проанализированы опухоли 40 пациентов с МЭК и определены по системам градации: AFIP, Brandwein, Modified Healy и MSKCC. Для оценки индексов пролиферации Ki-67 и интенсивности экспрессии GLUT1 использовали иммуногистохимическое исследование (ИГХ). ИГХ показало высокие индексы Ki-67 и GLUT1 у эпидермоидных и промежуточных клеток, при этом в мукоцитах выявлена низкая или отсутствующая экспрессия. Статистически значимые различия в экспрессии Ki-67 и GLUT1 обнаружены между эпидермоидными ( $p < 0,005$ ) и промежуточными клетками ( $p < 0,01$ ). Сравнения показали увеличение между степенями 1 и 2, 1 и 3, но без различий между степенями 2 и 3. Корреляция Спирмена выявила умеренные положительные связи для GLUT1 и Ki-67 с градацией опухоли, причем система AFIP показала наибольшую корреляцию (Ki-67:  $rs = 0,55$ ; GLUT1:  $rs = 0,50$ ). Таким образом, GLUT1 и Ki-67 наиболее интенсивно экспрессируются в эпидермоидных и промежуточных клетках, сильно коррелируя со степенью и агрессивностью опухоли, особенно при низкой и средней степени МЭК. Эти маркеры могут улучшить точность диагностики степени злокачественности МЭК. Система AFIP наиболее точно соответствует этим маркерам в эпидермоидных и промежуточных клетках.

**Ключевые слова:** GLUT-1, Ki-67, градация МЭК, AFIP, Brandwein, Modified Healy, MSKCC

**Вклад авторов:** И. И. Бабиченко — концепция и дизайн исследования; Д. Р. Фамилья Фриас, Ю. О. Тигай, З. Ю. Висайтова — сбор и обработка материала; Д. Р. Фамилья Фриас — написание текста; И. И. Бабиченко, А. А. Ивина — редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РУДН (протокол № 3 от 11 марта 2025 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Диана Р. Фамилья Фриас  
ул. Миклухо-Маклая, 21, к. 2, г. Москва, 117198, Россия; drff26@gmail.com

**Статья получена:** 13.03.2025 **Статья принята к печати:** 27.03.2025 **Опубликована онлайн:** 11.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.017

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## ASSESSING PROLIFERATIVE ACTIVITY AND GLUCOSE METABOLISM IN CELLS OF SALIVARY GLAND MUCOEPIDERMOID CARCINOMA USING DIFFERENT GRADING SYSTEMS

Familia Frias DR<sup>1</sup>✉, Visaitova ZYu<sup>2</sup>, Tigay YuO<sup>1</sup>, Ivina AA<sup>1</sup>, Babichenko II<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> National Medical Research Center of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

Mucoepidermoid carcinoma (MEC) is the most common malignant tumor of the salivary gland consisting of three main histological components: mucocytes, intermediate and epidermoid cells. Various grading systems (AFIP, Brandwein, modified Healy, MSKCC) are difficult to use. The Ki-67 and GLUT1 markers associated with tumor aggressiveness can improve MEC diagnosis and classification. The study aimed to assess the correlation of the cell proliferative activity and glucose metabolism with the MEC grading systems. Tumors of a total of 40 patients with MEC were analyzed and determined in accordance with the following grading systems: AFIP, Brandwein, modified Healy, and MSKCC. Immunohistochemistry (IHC) was used to estimate Ki-67 proliferation indices and GLUT1 expression intensity. IHC showed high Ki-67 indices and GLUT1 values in epidermoid and intermediate cells, while mucocytes showed low or no expression. There were significant differences in Ki-67 and GLUT1 expression between epidermoid ( $p < 0.005$ ) and intermediate cells ( $p < 0.01$ ). Comparison revealed the increase between grades 1 and 2, 1 and 3, but no differences between grades 2 and 3. Spearman's rank correlation test revealed moderate positive correlations with tumor grades for GLUT1 and Ki-67, and the AFIP system showed the highest correlation (Ki-67:  $rs = 0.55$ ; GLUT1:  $rs = 0.50$ ). Thus, GLUT1 and Ki-67 are most intensely expressed in epidermoid and intermediate cells showing a strong correlation with the tumor grade and aggressiveness, especially in low-grade and intermediate-grade MEC. These markers can improve the diagnosis of MEC malignancy degree. The AFIP system most closely matches these markers in epidermoid and intermediate cells.

**Keywords:** GLUT-1, Ki-67, MEC grading, AFIP, Brandwein, Modified Healy, MSKCC

**Author contribution:** Babichenko II — study concept and design; Familia Frias DR, Tigay YuO, Visaitova ZYu — data acquisition and processing; Familia Frias DR — manuscript writing; Babichenko II, Ivina AA — editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of RUDN (protocol No. 3 dated 11 March 2025).

✉ **Correspondence should be addressed:** Diana Rosina Familia Frias  
Mikluho-Maklaya, 21, str. 2, Moscow, 117198, Russia; drff26@gmail.com

**Received:** 13.03.2025 **Accepted:** 27.03.2025 **Published online:** 11.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.017

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Мукоэпидермоидная карцинома (МЭК) — самая распространенная злокачественная опухоль слюнных желез и встречается в 30% случаев выявления злокачественных опухолей слюнных желез [1]. Чаще всего МЭК поражает крупные слюнные железы, в частности околоушную слюнную железу (60% случаев), но может затрагивать и малые слюнные железы [2, 3].

В гистопатологической структуре МЭК выделяют мукоциты, промежуточные и эпидермоидные клетки в качестве основных компонентов, но могут также содержаться цилиндрические, светлые клетки и онкоциты, что представляет диагностические сложности для патологов [4–6]. Эти компоненты формируют различные гистологические структуры, такие как кистозная (наиболее распространенная и хорошо дифференцированная), солидная (редкая, с некрозом и со значительной клеточной и ядерной атипией) или солидно-кистозные структуры, которые характерны для опухолей, более склонных к инвазивному росту и формированию метастазов [7, 8].

МЭК может быть диагностирована на основании только ее гистологических особенностей, без использования других дополнительных исследований, таких как иммуногистохимическое (ИГХ) или генетические исследования, однако при постановке окончательного диагноза нередко возникают сложности [1]. В настоящее время создано множество систем градации для классификации МЭК, однако универсально признанной

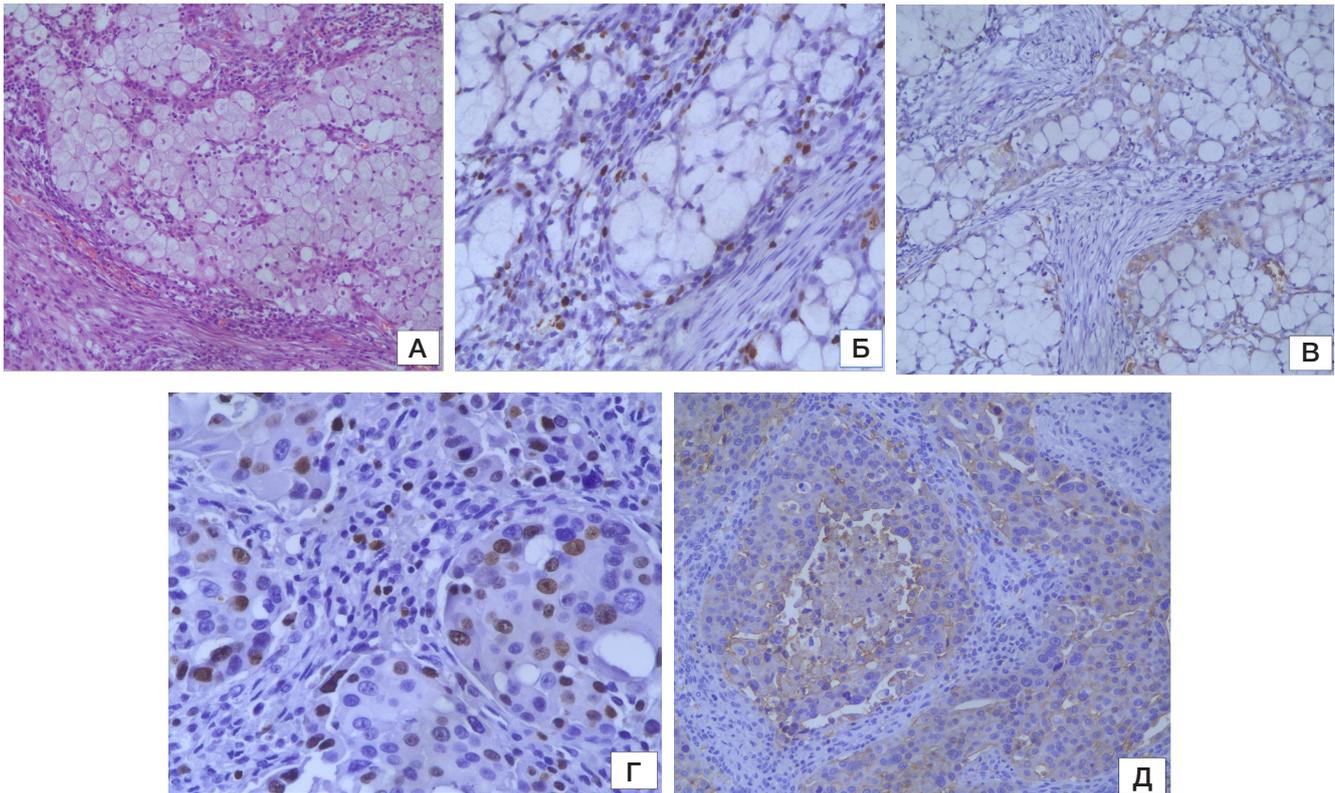
единой системы нет [9]. МЭК классифицируют как опухоль низкой (G1), средней (G2) или высокой (G3) степени злокачественности по четырем различным системам градации, таким как система Goode, Auclair и Ellis AFIP (Институт патологии Вооруженных сил) и система Brandwein, которые используют в повседневной гистопатологической практике [1, 4, 6], а также модифицированные системы градации Healy и MSKCC качественного характера (табл. 1). Методики AFIP и Brandwein не всегда согласуются при классификации одной и той же опухоли, особенно когда дело доходит до установления конкретных различий между опухолями G2- и G3-степени. Исследования, сравнивающие системы градации, показали различия при описании больших и малых слюнных желез [7, 10].

Канцерогенез — это многоэтапный процесс, в котором нарушения метаболизма глюкозы могут играть значительную роль из-за быстрого размножения клеток, характерного для злокачественного роста [11]. В современных исследованиях выявлены высокий энергетический метаболизм злокачественных опухолей и участие глюкозы в их росте. Глюкоза является основным источником энергии для клеток млекопитающих, а транспортеры глюкозы (GLUT) на цитоплазматической мембране способствуют ее проникновению в клетки. Таким образом, GLUT — важные ферменты, опосредующие метаболизм глюкозы в процессе канцерогенеза [12]. Высокая экспрессия GLUT1 в злокачественных опухолях

Таблица 1. Системы градации мукоэпидермоидной карциномы

Критерии	AFIP	Brandwein	Modified Healey	MSKCC
Кистозный компонент	(< 20%) 2	(< 25%) 2	L: макро + микрокисты I: микрокисты + солидные H: солидные ± микрокисты	L: преимущественно кистозная (> 80%) I: преимущественно солидная H: любая (обычно солидная)
Периневральное инвазирование (PI)	2	3	H: присутствует	n/a*
Некроз (N)	3	3	n/a	L: отсутствует I: отсутствует H: присутствует
Митозы	3 (≥ 4/10 HPF)	3 (≥ 4/10 HPF)	L: редкие I: немногочисленные H: многочисленные	L: 0–1/10 HPF I: 2–3/10 HPF H: 4+ /10 HPF
Ядерная анаплазия / плеоморфизм	4	2	L: отсутствует/минимальный I: небольшой/умеренный H: значительный (включая ядрышки)	L: незначительный I: незначительный H: любой
Граница / инвазивный фронт	n/a	2	L: широкая/ограниченная I: неограниченная H: инвазия в мягкие ткани / периневральная / сосудистая	L: хорошо ограниченная I: хорошо ограниченная или инфильтративная H: любая (обычно инфильтративная)
Лимфоваскулярное инвазирование	n/a	3	H: присутствует	n/a
Инвазия в кость	n/a	3	n/a	n/a
Промежуточные клетки	n/a	n/a	L: редкие I: более частые H: преобладающие	n/a
Строма	n/a	n/a	L: экстравазиванный муцин + фиброз + CI I: фиброз, разделяющий гнезда + CI H: десмоплазия, минимальный CI	n/a
Архитектура	n/a	n/a	L: дочерние кисты из больших I: более крупные каналы менее заметные H: переменная архитектура/морфология клеток	n/a
Градация	L — 0–4 I — 5–6 H — 7–14	L — 0 I — 2, 3 H — ≥ 4	L — низкая степень I — средняя степень H — высокая степень	

Примечание: n/a — неприменимо.



**Рис. 1.** МЭК, окраска гематоксилином и эозином —100 (А). Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67 ×200 (Б). Окрашивание цитоплазмы GLUT1 в эпидермоидных и промежуточных клетках, слабая реакция в клетках, продуцирующих муцин ×100 (В). Интенсивная пролиферативная активность по Ki-67 в эпидермоидных клетках ×400 (Г). Интенсивное окрашивание цитоплазматической мембраны GLUT1 в эпидермоидных клетках ×200 (Д). ИГХ-реакция с фоновым окрашиванием гематоксилином Майера DAB

связана с инвазией и метастазами, включая рак головы и шеи [13]. Золотым стандартом изучения злокачественных процессов слюнных желез является маркер пролиферации Ki-67. Роль Ki-67 в диагностике и классификации опухолей слюнных желез огромна: он напрямую коррелирует со скоростью клеточной пролиферации, которая является ключевым показателем агрессивности опухоли [14].

Цель исследования — дать оценку различных систем градации МЭК на основе пролиферативной активности и метаболизма глюкозы их клеток для определения степени злокачественности.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ретроспективно были проанализированы парафиновые блоки опухолей 40 пациентов (женщин и мужчин) с диагнозом «мукоэпидермоидная карцинома» из архива Лаборатории патологической анатомии ФГБУ НМИЦ «Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации за период с 2014 по 2023 г.

Морфологические исследования проводили согласно стандартным протоколам окраски гематоксилином и эозином. Гистологические препараты оценивали с использованием следующих четырех систем градации: модифицированная градация Nealy, градация MSKCC, градация AFIP и градация Brandwein. Эти системы сравнивали с итоговыми оценками каждого случая и коррелировали с ИГХ-исследованиями.

Гистологическое и ИГХ-исследования проводили в соответствии со стандартным протоколом. Все образцы биопсийного материала окрашивали моноклональными

антителами кролика от Thermo scientific (США, клон SP6) к белкам Ki-67, поликлональными антителами кролика от Thermo scientific (США) к белкам GLUT1. Полученный материал оценивали с помощью микроскопа AxioPlan 2 Imaging (Karl Zeiss, Германия) и для фотографирования препаратов использовали камеру AxioCam ERc5s (Karl Zeiss, Германия). Визуализацию ИГХ проводили при помощи системы визуализации UltraVision Quanto Detection System HRP DAB (США). Экспрессию белка пролиферации Ki-67 оценивали по индексу пролиферативной активности (процент клеток с интенсивно окрашенными ядрами на 300 ядер каждого типа клеток МЭК). Экспрессию GLUT1 изучали по окрашиванию цитоплазмы и/или цитоплазматических мембран и оценивали по условным критериям в баллах: отсутствие экспрессии — 0, слабая экспрессия — 1, умеренная экспрессия — 2, сильная экспрессия — 3.

Градацию МЭК проводили с использованием четырех систем, и корреляции между маркерами, клеточными компонентами и градациями анализировали с помощью тестов Краскала–Уоллиса, попарных сравнений Данна–Бонферрони и корреляции Спирмена. Статистический анализ проводили с использованием программы SPSS Statistics 23 версии в Windows 10 (IBM Corporation, США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Гистологическая градация

Система градации AFIP продемонстрировала более консервативный подход, позволяя классифицировать наибольшее количество опухолей, относящихся к низкой степени (G1) (40%), по сравнению с другими системами. Опухоли, классифицированные как опухоли средней

Таблица 2. Парные сравнения (метод Данна–Бонферрони)

Компонент клетки	Сравнение	Значимость ( $p < 0,05$ )
Эпидермоидные	G1–G2	0,003
	G1–G3	0,0003
	G2–G3	0,067
Промежуточные	G1–G2	0,036
	G1–G3	0,003
	G2–G3	0,23
Мукоциты	G1–G2	0,12
	G1–G3	0,12
	G2–G3	0,12

степени (G2), составили 35%, в то время как опухоли высокой степени (G3) — только 25%. Это распределение позволяет предположить, что по системе AFIP происходит присвоение опухолям более низких градаций, что приводит к потенциальному недооцениванию их агрессивности по сравнению с другими системами.

Для системы градации Brandwein характерен более агрессивный подход: наименьшему числу опухолей присваивается низкая степень (G1) (20%), в то время как наибольшее число классифицируется высокой степенью (G3) (45%). Опухоли, оцененные как опухоли средней степени (G2), составили 35%, что схоже с системой AFIP. Это позволяет предположить, что в системе Brandwein потенциально больше опухолей определяется агрессивными, но в некоторых случаях с риском переоценки тяжести заболевания.

В системе градации Modified Nealy представлено более сбалансированное распределение градаций: 25% опухолей, классифицированных как опухоли низкой степени (G1), 50% — как средней степени (G2) (наибольшая доля среди всех систем) и 25% — как высокой степени (G3). Эта система градации акцентирует внимание на промежуточной категории, что потенциально делает ее более полезной для идентификации граничных или умеренно агрессивных опухолей.

Система градации MSKCC продемонстрировала консервативный подход, аналогичный AFIP: 35% опухолей, классифицированных как опухоли низкой степени (G1), и 45% — как средней степени (G2). Однако наименьшее число опухолей было отнесено к высокой степени (G3) (20%), что отражает тенденцию снижения случаев более высоких степеней злокачественности МЭК. Это, в некоторых случаях, может привести к недооценке агрессивности опухолей.

### Иммуногистохимическое исследование

При изучении МЭК на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, были обнаружены мукоциты, промежуточные и эпидермоидные клетки (рис. 1А). ИГХ-исследование является эффективным дополнением к диагностике срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. В данном исследовании обнаружение ядерных антигенов Ki-67, связанных с клеточным циклом, позволило оценить активность пролиферации клеток, а GLUT1 в качестве показателя метаболизма глюкозы в МЭК.

Во всех клеточных компонентах МЭК белок Ki-67 был обнаружен в ядрах клеток (рис. 1Б, Г), а GLUT1 — в цитоплазме и на цитоплазматической мембране (рис. 1В, Д). Распределение индексов пролиферации Ki-67 значительно

отличалось между тремя компонентами МЭК (эпидермоидный, промежуточный, мукоидный). Детализированный статистический анализ указывал на высокий уровень пролиферации по Ki-67 в эпидермоидных клетках, где медиана составила 13,3% (9,3; 20,0). Промежуточные клетки продемонстрировали более низкие уровни пролиферации по сравнению с эпидермоидными, с медианой равной 6,7% (3,5; 10,7), а мукоциты показали минимальную экспрессию Ki-67 с медианой 1,3% (0,0; 2,7).

Для оценки связи между индексами Ki-67 и градацией опухоли были проведены тест Краскала–Уоллиса и парные сравнения. Статистически значимые различия в индексах Ki-67 были обнаружены между градациями опухолей для эпидермоидных ( $N = 16,25$ ,  $p = 0,0003$ ) и промежуточных ( $N = 10,85$ ,  $p = 0,0045$ ), но не для мукоцитов ( $N = 4,12$ ,  $p = 0,12$ ).

Парные сравнения с использованием метода Данна–Бонферрони показали, что значительные различия были обнаружены для эпидермоидных и промежуточных клеток (табл. 2). Мукоциты не показали значительных различий по градациям.

При статистическом корреляционном анализе методом Спирмена определена значительная взаимосвязь между индексами пролиферации по Ki-67 и степенью злокачественности МЭК по трем изучаемым компонентам. Самая сильная корреляция обнаружена у эпидермоидных клеток ( $0,53$ ,  $p = 0,0005$ ). Данный показатель предполагает, что с увеличением степени злокачественности опухоли увеличивается индекс пролиферации Ki-67 в эпидермоидных клетках и увеличивается последовательно, что придает большое значение при изучении агрессивности опухолевого процесса и может быть использовано как маркер агрессивности опухоли. Умеренно положительная корреляция наблюдалась также у промежуточных клеток ( $r_s = 0,47$ ,  $p = 0,0025$ ), что подтверждает их вклад в прогрессирование опухоли, хотя в меньшей степени, чем у эпидермоидных клеток. В отличие от этого, мукоциты показали слабую и статистически незначимую корреляцию ( $r_s = 0,25$ ,  $p = 0,12$ ), что отражает их минимальную пролиферативную активность и ограниченную роль в градации опухоли (1Д).

Градация МЭК по подсчету пролиферативной активности в эпидермоидных и промежуточных клетках предполагает низкую степень (G1) с активностью менее 10%, промежуточную степень (G2) от 10% до 15% и высокую степень (G3), превышающую 15–20%. Эти градации, основанные на маркировке Ki-67, дают важную информацию о биологическом поведении МЭК, позволяя определять степень злокачественности опухоли с помощью количественных показателей пролиферации различных клеточных популяций внутри опухоли.

При анализе интенсивности окраски GLUT1 по всем образцам выявлены значительные различия между тремя компонентами. Промежуточные и эпидермоидные клетки продемонстрировали наивысшую среднюю интенсивность окраски с медианой 2 балла (1; 3), что указывает на умеренные уровни изменчивости, в то время как мукоциты показали наименьшую интенсивность медианой 0 баллов (0; 0), отражая последовательно низкое или отсутствующее выражение GLUT1 в этом компоненте (рис. 1Г).

Тесты Краскала–Уоллиса позволили выявить значительные различия в интенсивности окраски GLUT1 по степеням злокачественности опухоли для эпидермоидных клеток ( $p = 0,005$ ) и промежуточных клеток ( $p = 0,01$ ), но не для мукоцитов ( $p = 0,15$ ). Парные сравнения с использованием метода Данна–Бонферрони показали, что для эпидермоидных и промежуточных клеток интенсивность окраски значительно увеличивалась между степенью 1 и степенью 2, а также между степенью 1 и степенью 3. Однако значимые различия между степенями 2 и 3 не обнаружены для обоих компонентов, что позволяет предположить наличие плато в экспрессии GLUT1 при более высоких степенях опухоли. Мукоидные клетки показали низкую интенсивность и равномерность окрашивания вне зависимости от степени малигнизации опухолевого процесса слюнной железы, статистически значимые различия тоже не были обнаружены.

В дополнение к статистическому анализу был проведен анализ корреляции Спирмена, где также определяли взаимосвязь интенсивности окрашивания по GLUT1 со степенью злокачественности опухоли. Были получены следующие результаты: эпидермоидные клетки —  $rs = 0,48$  ( $p = 0,003$ ), промежуточные клетки —  $rs = 0,42$  ( $p = 0,008$ ). Эти данные указывают на умеренно положительную корреляцию со степенью злокачественности опухоли и указывают на прогрессивное увеличение экспрессии GLUT1 в зависимости от увеличения ее агрессивности. В отличие от этого, мукоциты показали слабую и незначимую корреляцию ( $rs = 0,15$ ,  $p = 0,36$ ), что отражает их незначительный вклад в градацию опухоли.

При МЭК оценка интенсивности окрашивания GLUT1 различных клеточных компонентов позволяет получить критическое представление о метаболической активности, связанной с различными степенями злокачественности. Эпидермоидные и промежуточные клетки демонстрируют прогрессирующее увеличение экспрессии GLUT1. Это прогрессирование отражает значительное повышение метаболической активности по мере увеличения степени злокачественности опухоли — от низкой степени с минимальной экспрессией GLUT1, что указывает на снижение метаболических потребностей, до высокой степени, когда интенсивность окрашивания приближается к максимальной, свидетельствуя о высокой метаболической активности, необходимой для быстрого роста и агрессивности опухоли.

#### Корреляция между GLUT1 и Ki-67 в различных компонентах МЭК

Анализ корреляции Спирмена позволил выявить сильную положительную связь между интенсивностью окраски GLUT1 и Ki-67 в эпидермоидных клетках ( $rs = 0,68$ ,  $p < 0,001$ ). Это указывает на то, что более высокая экспрессия GLUT1 стабильно ассоциируется с увеличенной пролиферативной активностью в этом компоненте. Умеренная положительная

корреляция была обнаружена в промежуточных клетках ( $rs = 0,52$ ,  $p = 0,004$ ), что позволяет предположить наличие значимой, хотя и менее выраженной, ассоциации между двумя маркерами. В отличие от этого, мукоциты показали слабую и незначимую корреляцию ( $rs = 0,20$ ,  $p = 0,18$ ), что отражает минимальное взаимодействие между экспрессией GLUT1 и пролиферацией Ki-67 в этом компоненте.

Оба маркера, GLUT1 и Ki-67, продемонстрировали высокую корреляцию и сильную взаимосвязь в эпидермоидных и промежуточных клетках. В эпидермоидных клетках для GLUT1 и Ki-67 были получены следующие значения:  $rs = 0,48$  ( $p = 0,003$ ) и  $rs = 0,53$  ( $p = 0,0005$ ). Аналогично, в промежуточных клетках: GLUT1 —  $rs = 0,42$  ( $p = 0,008$ ) и Ki-67 —  $rs = 0,47$  ( $p = 0,0025$ ). Это указывает на умеренную корреляцию со степенью малигнизации процесса, что придает выбранным маркерам большую роль в исследовании прогрессирования опухоли. В отличие от эпидермоидных и промежуточных клеток, мукоциты при изучении корреляции со степенью злокачественности показали слабую взаимосвязь как для GLUT1, где  $rs = 0,15$  при  $p = 0,36$ , так и для Ki-67, где  $rs = 0,25$  при  $p = 0,12$ , что еще раз подчеркивает их ограниченное участие в градации опухоли.

#### Корреляция GLUT1 с системами градации опухолей

Интенсивность окраски GLUT1 продемонстрировала умеренные положительные значения корреляции со степенями злокачественности опухолей во всех системах градации. Наиболее сильная корреляция наблюдалась с системой AFIP ( $rs = 0,50$ ,  $p = 0,001$ ), это указывает на то, что GLUT1 хорошо согласуется с агрессивностью опухолей, определенной критериями AFIP. Система Modified Healy ( $rs = 0,48$ ,  $p = 0,002$ ) также показала сопоставимую корреляцию. Системы Brandwein ( $rs = 0,45$ ,  $p = 0,003$ ) и MSKCC ( $rs = 0,40$ ,  $p = 0,01$ ) продемонстрировали несколько более слабые корреляции, что предполагает менее прочное соответствие GLUT1 их критериям градации.

#### Корреляция Ki-67 с системами градации опухолей

Индексы пролиферации Ki-67 продемонстрировали более сильную корреляцию со степенью злокачественности опухолей, чем GLUT1, во всех системах градации. Наивысшая корреляция была отмечена с системой AFIP ( $rs = 0,55$ ,  $p = 0,0005$ ), за которой следует система Modified Healy ( $rs = 0,52$ ,  $p = 0,001$ ). Эти результаты подчеркивают эффективность Ki-67 как надежного маркера прогрессирования опухоли, особенно в рамках этих систем градации. Системы Brandwein ( $rs = 0,48$ ,  $p = 0,002$ ) и MSKCC ( $rs = 0,45$ ,  $p = 0,003$ ) также продемонстрировали умеренную корреляцию, но несколько слабее, чем системы AFIP и Modified Healy.

#### Сравнение систем градации

Среди четырех проанализированных систем градации система AFIP последовательно демонстрировала самую сильную корреляцию как с экспрессией GLUT1, так и с Ki-67, что позволяет предположить наиболее тесное соответствие биологии опухоли, отраженной этими маркерами. Система Modified Healy показала практически такие же результаты,

Таблица 3. Корреляция между GLUT1 и Ki-67 и степенями злокачественности опухолей

Корреляция между GLUT1 и степенями опухолей		
Система градации	Коэффициент корреляции (rs)	p-значение
AFIP	0,5	0,001
Brandwein	0,45	0,003
Modified Healy	0,48	0,002
MSKCC	0,4	0,01
Корреляция между Ki-67 и степенями опухолей		
Система градации	Коэффициент корреляции (rs)	p-значение
AFIP	0,55	0,0005
Brandwein	0,48	0,002
Modified Healy	0,52	0,001
MSKCC	0,45	0,003

особенно для Ki-67, что делает ее еще одной надежной основой для оценки агрессивности опухоли. Системы Brandwein и MSKCC продемонстрировали несколько более слабую корреляцию, особенно для GLUT1, что указывает на меньшее согласование с метаболической и пролиферативной активностью (табл. 3).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании изучали пролиферативную активность (Ki-67) и активность белка, транспортирующего глюкозу (GLUT1), различных компонентов МЭК, которые были обнаружены во всех клеточных компонентах. Высокий уровень экспрессии выбранных белков выявлен в эпидермоидных и промежуточных клетках МЭК, что указывает на рост и агрессивность опухолевого процесса. Полученные результаты схожи с данными, представленными ранее [15, 16], по которым экспрессия GLUT1 была выше в эпидермоидном компоненте и опухолях высокой степени злокачественности соответственно.

Индекс Ki-67 служит важнейшим биомаркером для определения степени злокачественности МЭК, что дополняет традиционные гистологические исследования. Так, у 46 пациентов низкий индекс Ki-67 коррелировал с благоприятным прогнозом, в то время как более высокий индекс указывал на повышенный риск агрессивного поведения при заболевании [17]. В отличие от более субъективной гистологической оценки, которая косвенно измеряет пролиферативную активность по доле солидных участков, индекс Ki-67 позволяет напрямую определить пролиферацию путем подсчета активно делящихся клеток. Такой прямой подход делает его более объективным и надежным маркером, позволяющим четко различать вялотекущую и агрессивную формы МЭК [14, 17]. Таким образом, использование индекса Ki-67 наряду с гистологической оценкой может значительно повысить точность прогнозирования клинического течения этих опухолей, обеспечивая бесценное руководство для целенаправленных терапевтических стратегий.

В основном такие системы изучения градации, как AFIP и MSKCC, склонны к консервативной градации, что подчеркивает низкие и промежуточные классификации, в то время как для системы Brandwein характерны более

агрессивный подход и большая эффективность при работе с опухолями высокой степени злокачественности. Система Modified Healy более эффективна при работе с опухолями промежуточной степени. Эти вариации подчеркивают влияние критериев градации на классификацию опухолей и важность согласования системы градации с клиническими целями, такими как стратификация риска или планирование лечения.

#### ВЫВОДЫ

Данное исследование подчеркивает ключевую роль GLUT1 и Ki-67 в оценке метаболической и пролиферативной активности МЭК слюнных желез. Высокая экспрессия этих маркеров выявлена в эпидермоидных и промежуточных клетках и соответствовала следующим цифрам: низкая степень — Ki-67 менее 10%, интенсивность GLUT1 составляет 1–2; средняя степень — Ki-67 от 10 до 15%, интенсивность GLUT1 составляет 2; высокая степень — Ki-67 >15%, интенсивность GLUT1 составляет 3. Полученные данные коррелировали со степенью злокачественности опухоли, в то время как мукоциты продемонстрировали минимальную активность. GLUT1 и Ki-67 помогают эффективно различать опухоли низкой степени (G1) от средней (G2) и высокой (G3) степеней, при этом между степенями 2 и 3 наблюдается эффект плато. Среди четырех проанализированных систем градации система AFIP показала наиболее сильную корреляцию с этими биомаркерами, что указывает на ее соответствие биологическому поведению МЭК. Система Modified Healy также показала хорошие результаты, подходит для опухолей средней степени злокачественности, в то время как система Brandwein больше подходит для работы с высокоагрессивными низкодифференцированными опухолями, а система MSKCC кажется более консервативной. Эти результаты подчеркивают потенциальную полезность интеграции ИГХ-маркеров, таких как GLUT1 и Ki-67, в протоколы градации МЭК для повышения точности диагностики и прогностической оценки. Однако несоответствия между системами градации подчеркивают необходимость стандартизированных подходов. Для подтверждения этих результатов и изучения эффективности дополнительных маркеров в улучшении диагностики, градации и планирования лечения МЭК необходимы дальнейшие масштабные исследования.

## Литература

- Peraza A, Gómez R, Beltran J, Amarista FJ. Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2020; 121: 713–20.
- Ullah A, Khan J, Waheed A, et al. Mucoepidermoid Carcinoma of the Salivary Gland: Demographics and Comparative Analysis in U.S. Children and Adults with Future Perspective of Management. *Cancers (Basel).* 2022; 15 (1): 250. Published 2022. DOI: 10.3390/cancers15010250.
- Robinson L, van Heerden MB, Ker-Fox JG, Hunter KD, van Heerden WFP. Expression of Mucins in Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2021; 15 (2): 491–502. DOI: 10.1007/s12105-020-01226-z.
- El-Naggar AK, Chan JKC, Rubin-Grandis J, Takata T, Slootweg PJ, International Agency for Research on Cancer. World Health Organization classification of tumours. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.
- Donempudi P, Bhayya H, Venkateswarlu M, Avinash Tejasvi M L, Paramkusam G. Mucoepidermoid carcinoma of the minor salivary gland: Presenting as ranula. *J Can Res Ther.* 2018; 14: 1418–21.
- Fehr A, Werenicz S, Trocchi P et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands revisited with special reference to histologic grading and CRTC1/3-MAML2 genotyping. *Virchows Arch* (2021). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03146-x>.
- Lin HH, Limesand KH, Ann DK. Current State of Knowledge on Salivary Gland Cancers. *Crit Rev Oncog.* 2018; 23 (3–4): 139–51. DOI: 10.1615/CritRevOncog.2018027598.
- Gotoh S, Nakasone T, Matayoshi A, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the anterior lingual salivary gland: A rare case report. *Mol Clin Oncol.* 2022; 16 (1): 7. DOI: 10.3892/mco.2021.2444.
- Cipriani NA, Lusardi JJ, McElherne J, Pearson AT, Olivas AD, Fitzpatrick C, et al. Mucoepidermoid carcinoma: A comparison of histologic grading systems and relationship to MAML2 rearrangement and prognosis. *Am J Surg Pathol.* 2019; 43: 885–97.
- Qannam A, Bello IO. Comparison of histological grading methods in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. *Indian J Pathol Microbiol.* 2016; 59: 457–62. DOI: 10.4103/0377-4929.191765.
- Sampedro-Núñez M, Bouthelie A, Serrano-Somavilla A, et al. LAT-1 and GLUT1 Carrier Expression and Its Prognostic Value in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers (Basel).* 2020; 12 (10): 2968. Available from: <https://doi.10.3390/cancers12102968>.
- Yang H, Zhong JT, Zhou SH, Han HM. Roles of GLUT1 and HK-II expression in the biological behavior of head and neck cancer. *Oncotarget.* 2019; 10 (32): 3066–83. DOI: 10.18632/oncotarget.24684.
- Kang F, Ma W, Ma X, et al. Propranolol inhibits glucose metabolism and 18F-FDG uptake of breast cancer through posttranscriptional downregulation of hexokinase-2. *J Nucl Med.* 2014; 55 (3): 439–45. DOI: 10.2967/jnumed.113.121327.
- Kaza S, Rao TJM, Mikkilineni A, Ratnam GV, Rao DR. Ki-67 Index in Salivary Gland Neoplasms. *Int J Phonosurg Laryngol.* 2016; 6 (1): 1–7.
- de Souza LB, de Oliveira LC, Nonaka CFW, et al. Immunoexpression of GLUT1 and angiogenic index in pleomorphic adenomas, adenoid cystic carcinomas, and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017; 274: 2549–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4530-y>.
- Demasi APD, Costa AF, Altemani A, Furuse C, Araújo NS and Araújo VC. Glucose transporter protein 1 expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland: correlation with grade of malignancy. *International Journal of Experimental Pathology.* 2010; 91: 107–13. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00702.x>.
- Skalova A, Lehtonen H, von Boguslawsky K, Leivo I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections. *Hum Pathol.* 1994; 25 (9): 929–35. DOI: 10.1016/0046-8177(94)90014-0.

## References

- Peraza A, Gómez R, Beltran J, Amarista FJ. Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2020; 121: 713–20.
- Ullah A, Khan J, Waheed A, et al. Mucoepidermoid Carcinoma of the Salivary Gland: Demographics and Comparative Analysis in U.S. Children and Adults with Future Perspective of Management. *Cancers (Basel).* 2022; 15 (1): 250. Published 2022. DOI: 10.3390/cancers15010250.
- Robinson L, van Heerden MB, Ker-Fox JG, Hunter KD, van Heerden WFP. Expression of Mucins in Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2021; 15 (2): 491–502. DOI: 10.1007/s12105-020-01226-z.
- El-Naggar AK, Chan JKC, Rubin-Grandis J, Takata T, Slootweg PJ, International Agency for Research on Cancer. World Health Organization classification of tumours. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017.
- Donempudi P, Bhayya H, Venkateswarlu M, Avinash Tejasvi M L, Paramkusam G. Mucoepidermoid carcinoma of the minor salivary gland: Presenting as ranula. *J Can Res Ther.* 2018; 14: 1418–21.
- Fehr A, Werenicz S, Trocchi P et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands revisited with special reference to histologic grading and CRTC1/3-MAML2 genotyping. *Virchows Arch* (2021). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03146-x>.
- Lin HH, Limesand KH, Ann DK. Current State of Knowledge on Salivary Gland Cancers. *Crit Rev Oncog.* 2018; 23 (3–4): 139–51. DOI: 10.1615/CritRevOncog.2018027598.
- Gotoh S, Nakasone T, Matayoshi A, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the anterior lingual salivary gland: A rare case report. *Mol Clin Oncol.* 2022; 16 (1): 7. DOI: 10.3892/mco.2021.2444.
- Cipriani NA, Lusardi JJ, McElherne J, Pearson AT, Olivas AD, Fitzpatrick C, et al. Mucoepidermoid carcinoma: A comparison of histologic grading systems and relationship to MAML2 rearrangement and prognosis. *Am J Surg Pathol.* 2019; 43: 885–97.
- Qannam A, Bello IO. Comparison of histological grading methods in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. *Indian J Pathol Microbiol.* 2016; 59: 457–62. DOI: 10.4103/0377-4929.191765.
- Sampedro-Núñez M, Bouthelie A, Serrano-Somavilla A, et al. LAT-1 and GLUT1 Carrier Expression and Its Prognostic Value in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers (Basel).* 2020; 12 (10): 2968. Available from: <https://doi.10.3390/cancers12102968>.
- Yang H, Zhong JT, Zhou SH, Han HM. Roles of GLUT1 and HK-II expression in the biological behavior of head and neck cancer. *Oncotarget.* 2019; 10 (32): 3066–83. DOI: 10.18632/oncotarget.24684.
- Kang F, Ma W, Ma X, et al. Propranolol inhibits glucose metabolism and 18F-FDG uptake of breast cancer through posttranscriptional downregulation of hexokinase-2. *J Nucl Med.* 2014; 55 (3): 439–45. DOI: 10.2967/jnumed.113.121327.
- Kaza S, Rao TJM, Mikkilineni A, Ratnam GV, Rao DR. Ki-67 Index in Salivary Gland Neoplasms. *Int J Phonosurg Laryngol.* 2016; 6 (1): 1–7.
- de Souza LB, de Oliveira LC, Nonaka CFW, et al. Immunoexpression of GLUT1 and angiogenic index in pleomorphic adenomas, adenoid cystic carcinomas, and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017; 274: 2549–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00405-017-4530-y>.
- Demasi APD, Costa AF, Altemani A, Furuse C, Araújo NS and Araújo VC. Glucose transporter protein 1 expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland: correlation with grade of malignancy. *International Journal of Experimental Pathology.* 2010; 91: 107–13. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2009.00702.x>.
- Skalova A, Lehtonen H, von Boguslawsky K, Leivo I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections. *Hum Pathol.* 1994; 25 (9): 929–35. DOI: 10.1016/0046-8177(94)90014-0.

## ЭКСПРЕССИЯ PD-1 В ИММУННЫХ КЛЕТКАХ МИКРООКРУЖЕНИЯ ОПУХОЛИ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ И МЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

А. Ю. Калинин, Е. А. Царенкова, Д. М. Лоос, А. А. Мох, Е. О. Родионов, С. В. Миллер, Е. С. Григорьева , Л. А. Таширева

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Клиническое значение экспрессии белка PD-1 в микроокружении опухоли рака легких, особенно в контексте иммунотерапии, остается плохо изученным. Целью исследования было оценить экспрессию PD-1 в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках и ее связь с клиническими исходами у пациентов с раком легких. У 20 пациентов (17 мужчин и три женщины, средний возраст составил  $56 \pm 6,9$  лет) с раком легкого с помощью мультиплексной иммунофлуоресценции *in situ* был проведен анализ четырех ключевых популяций иммунных клеток, вовлеченных в ответ на иммунотерапию, с фокусом внимания на паттернах экспрессии PD-1 и их корреляции с выживаемостью без прогрессирования (progression-free survival, PFS). Экспрессию PD-1 преимущественно наблюдали на CD8<sup>+</sup>-лимфоцитах, хотя и на низком уровне (~5%), что предполагает состояние истощения Т-клеток. Иммунные клетки, экспрессирующие PD-1, встречались редко в микроокружении как немелкоклеточного, так и мелкоклеточного рака легких, возможно в связи с тем, что большинство иммунных клеток остаются функционально активными. Дефицитом клеток PD-1<sup>+</sup> можно объяснить ограниченную терапевтическую эффективность антител против PD-1. Выявлено, что инфильтрация CD20<sup>+</sup> В-клетками является независимым предиктором низкой PFS (HR = 0,17; 95% CI: 0,02–0,65;  $p = 0,0454$ ), и это подчеркивает ранее недооцененную роль В-клеток в прогрессировании рака легких. Показано также, что наличие отдаленных метастазов (стадия M1), высокая доля макрофагов PD-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> и низкая доля лимфоцитов PD-1<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> связаны с более короткой PFS, что подчеркивает сложное взаимодействие между популяциями клеток в опухолевом микроокружении. Эти результаты свидетельствуют о том, что иммунные субпопуляции, экспрессирующие PD-1, в частности цитотоксические лимфоциты и регуляторные Т-клетки, могут служить прогностическими маркерами и потенциальными терапевтическими мишенями.

**Ключевые слова:** экспрессия PD-1, микроокружение опухоли, иммунные контрольные точки, рак легкого

**Финансирование:** исследование поддержано Российским научным фондом (грант № 20-75-10033-П).

**Вклад авторов:** А. Ю. Калинин — поиск литературы, получение и статистическая обработка результатов, написание статьи; Е. А. Царенкова, Д. М. Лоос — получение и анализ данных; А. А. Мох, Е. О. Родионов — курация пациентов; С. В. Миллер — сбор данных; Е. С. Григорьева — редактирование статьи; Л. А. Таширева — планирование и руководство исследованием, анализ и интерпретация результатов, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом Томского национального исследовательского медицинского центра НИИ онкологии (протокол № 7 от 25 августа 2020 г. и протокол № 18 от 25 августа 2023 г.), проведено в соответствии с федеральными законами Российской Федерации и Хельсинкской декларацией 1964 г. со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими проведение научных исследований биоматериала, полученного от человека. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

 **Для корреспонденции:** Евгения Сергеевна Григорьева, пер. Кооперативный, д. 5, г. Томск, 634009, Россия; grigoryeva.es@gmail.com

**Статья получена:** 04.03.2025 **Статья принята к печати:** 17.03.2025 **Опубликована онлайн:** 24.03.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.014

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## PD1 EXPRESSION IN IMMUNE CELLS WITHIN THE TUMOR MICROENVIRONMENT OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL AND SMALL CELL LUNG CANCER

Kalinchuk AYu, Tsarenkova EA, Loos DM, Mokh AA, Rodionov EO, Miller SV, Grigoryeva ES , Tashireva LA

The Laboratory of Molecular Therapy of Cancer, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

The clinical significance of programmed cell death protein 1 (PD-1) expression in the tumor microenvironment (TME) of lung cancer, particularly in the context of immunotherapy, remains poorly understood. This study aimed to evaluate PD-1 expression in tumor-infiltrating immune cells and its association with clinical outcomes in lung cancer patients. In a study of 20 patients (17 men and three women, average age  $56 \pm 6.9$  years) with lung cancer, four key immune cell populations involved in the immunotherapy response were analyzed using multiplexed *in situ* immunofluorescence. The focus was on PD-1 expression patterns and their correlation with progression-free survival (PFS). Our findings revealed that PD-1 expression was predominantly observed on CD8<sup>+</sup> lymphocytes, albeit at low levels (~5%), suggesting a state of T-cell exhaustion. Notably, PD-1-expressing immune cells were rare in both non-small-cell and small-cell lung cancer microenvironments, indicating that most immune cells remain functionally active. This deficit of PD-1<sup>+</sup> cells may explain the limited therapeutic efficacy of anti-PD-1 antibodies. Furthermore, we identified CD20<sup>+</sup> B-cell infiltration as an independent predictor of poorer PFS (HR = 0.17, 95% CI: 0.02–0.65,  $p = 0.0454$ ), highlighting a previously underappreciated role of B cells in lung cancer progression. Additionally, the presence of distant metastases (stage M1), a high proportion of PD-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> macrophages, and a low proportion of PD-1<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> lymphocytes were associated with shorter PFS, underscoring the complex interplay between immunosuppressive and immunostimulatory cell populations in the TME. These findings suggest that PD-1-expressing immune subsets, particularly cytotoxic lymphocytes and regulatory T cells, may serve as prognostic markers and potential therapeutic targets.

**Keywords:** PD1 expression, tumor microenvironment, immune checkpoint, lung cancer

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation (grant № 20-75-10033-П).

**Author contribution:** Kalinchuk AYu — literature search, obtaining and statistically processing the results, writing the article; Tsarenkova EA — obtaining and analyzing data; Loos DM — obtaining and analyzing data; Mokh AA — patients' curation; Rodionov EO — patients' curation; Miller SV — data collection; ES Grigoryeva — editing the article; Tashireva LA — study planning and supervision, analysis, and interpretation of results, writing the article.

**Compliance with ethical standards:** The study was approved by the Ethics Committee of the Tomsk National Research Medical Center Oncology Research Institute (protocol № 7, 25 August 2020; protocol № 18, 25 August 2023), conducted in accordance with federal laws of the Russian Federation and the 1964 Helsinki Declaration with all subsequent additions and amendments regulating scientific research on biomaterial obtained from humans. All participants signed informed voluntary consent to participate in the study.

 **Correspondence should be addressed:** Evgenia S. Grigoryeva pereulok Kooperativny, 5, Tomsk, Russia; 634009; grigoryeva.es@gmail.com

**Received:** 04.03.2025 **Accepted:** 17.03.2025 **Published online:** 24.03.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.014

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Иммунное микроокружение в опухолях активно участвует в процессах развития и прогрессирования рака. Эту роль подчеркивает быстрое развитие терапевтических подходов, направленных на модуляцию иммунного микроокружения, в том числе при раке легких. В серии фундаментальных исследований на модельных системах выявлены патогенетические механизмы прогрессирования и факторы микроокружения, связанные с резистентностью к иммунотерапии при раке легких [1]. Например, высокий процент лимфоцитов CD8<sup>+</sup>, экспрессирующих PD-1, коррелировал с ограниченным ответом на блокаду PD-1 при поликлональной стимуляции Т-клеток [2]. В ходе изучения взаимосвязи иммунологических параметров и клинического течения заболевания у пациентов были выявлены закономерности, указывающие на значимость иммунного микроокружения [3]. Таким образом, классификация опухолевого иммунного микроокружения (tumor immune microenvironment, TIMT) на основе лимфоцитов PD-1/PD-L1 и CD8<sup>+</sup>, инфильтрирующих опухоль (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL), эффективно стратифицирует пациентов с аденокарциномой легких на группы с различными показателями выживаемости. Примечательно, что группа с низким количеством лимфоцитов CD8<sup>+</sup> и высокой экспрессией PD-1/PD-L1 демонстрирует самые плохие результаты [4]. Микроокружение имеет не меньшую важность в исследованиях по изучению его связи с ответами на иммунотерапию. Например, показатель отношения иммунных генов, генов цитокератинов и контрольных иммунных точек (IKCscore, от англ. immune-keratin-immune checkpoint score), который выводят из коэффициентов экспрессии различных генов, кодирующих иммунные маркеры и цитокератины, является многообещающим индикатором для прогнозирования эффективности иммунотерапии и комбинированной терапии на основе иммунотерапии при немелкоклеточном раке легких (НМРЛ). Кроме того, уровни инфильтрации лимфоцитами CD8<sup>+</sup>, покоеющимися Т-клетками памяти CD4<sup>+</sup> и покоеющимися дендритными клетками значительно выше в группе с высоким IKCscore по сравнению с группой с низким IKCscore [5]. Экспрессия лиганда программируемой смерти 1 (PD-L1) на опухолевых клетках и мутационная нагрузка опухоли (tumor mutational burden, TMB) были идентифицированы как предикторы ответа на иммунотерапию. Однако реальная клиническая практика показывает, что одних этих биомаркеров недостаточно для эффективного отбора пациентов для такого типа терапии. Интересно, что, несмотря на обширные исследования характеристик микроокружения опухоли при раке легких, некоторые аспекты, имеющие отношение к иммунотерапии, остаются неизученными.

Один из классов иммунотерапевтических агентов включает антитела к PD-1, которые нацелены на рецептор, а не на лиганд. Тем не менее, экспрессия PD-1 в микроокружении рака легких плохо изучена. В связи с широкой доступностью терапевтических вариантов, включающих ингибиторы иммунных контрольных точек, понимание особенностей микроокружения опухоли становится решающим, и может способствовать выявлению новых ассоциаций с эффективностью иммунотерапии. Цель данного исследования — оценить экспрессию PD-1 в инфильтрирующих опухоль иммунных клетках и ее связь с клиническими исходами у пациентов с раком легких.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Пациенты

В исследовании приняли участие 20 пациентов (17 мужчин и три женщины). Критерии включения: морфологически верифицированный диагноз рака легкого. У 12 из 20 пациентов был поставлен диагноз «немелкоклеточного рака легкого», у восьми — «мелкоклеточного рака легкого». Все пациенты имели III–IV стадии заболевания (у 10 пациентов III стадия, у 10 — IV стадия), средний возраст составил 56 ± 6,9 лет. Критерии исключения: наличие рака легкого I–II стадии; наличие сопутствующих аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Пациенты прошли полный курс лечения в соответствии с клиническими рекомендациями (комбинированную терапию, включающую химиотерапию первой и последующих линий по схемам карбоплатин/паклитаксел, пеметрексед/карбоплатин, карбоплатин/этопозид, монокимиотерапию таксанами, деносумаб, химиоиммунотерапию, при наличии показаний пациентам выполняли дистанционную лучевую терапию). Медиана наблюдения составила 12 месяцев.

### Имунофенотипирование опухолевого микроокружения

Образцы опухолевой ткани были собраны до начала лечения, зафиксированы в формалине и залиты в парафин с использованием стандартных методов. Затем проводили многоцветное иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание ткани рака легкого с усилением сигнала тирамидом (TSA). Использовали следующие первичные антитела: человеческие анти-CD8 (Ventana, Швейцария; клон SP57, разведение 1 : 10), анти-PD-1 (ABclonal, Китай; клон AMC0439, разведение 1 : 500), анти-CD20 (Leica Biosystems, Германия; клон L26, разведение 1 : 600), анти-CD163 (Diagnostic Biosystems, США; клон 10D6, разведение 1 : 150) и моноклональные антитела анти-FoxP3 (Invitrogen, США; клон 236A/E7, разведение 1 : 800). Для визуализации использовали систему EnVision FLEX/HRP (Dako, Дания) и набор Opal 7-color Fluorophore Kit (Akoya Biosciences, США), включающий тирамид, конъюгированный с флуорофорами. Процедуру окрашивания проводили на автоматическом иммуногистохимическом оборудовании BOND RXm (Leica, Германия). Протокол включал демаскировку антигена с использованием буфера Epitope Retrieval Solution 2 (Leica Biosystems, Германия) при 98,5 °C в течение 20 мин, за которым следовали пять последовательных циклов окрашивания. Каждый цикл состоял из следующих этапов: 10-минутная инкубация с реагентом EnVision FLEX Peroxidase-blocking (Dako, Дания), 10-минутная инкубация с Novocastra Protein Block (Leica Biosystems, Германия), 30-минутная инкубация с первичным антителом, 30-минутная инкубация с EnVision FLEX/HRP и 20-минутная инкубация с красителем Opal. После каждого цикла проводили отмывку первичных и вторичных антител с использованием буфера Epitope Retrieval Solution 2. Ядра клеток контрастировали вручную с использованием Fluoroshield™ с DAPI (Sigma-Aldrich, США). Визуализацию и получение изображений (рис. 1) проводили с использованием системы Vectra® 3.0 (Akoya Biosciences, США), а количественный анализ клеток — с использованием программного обеспечения inForm® (Akoya Biosciences, США) на основе данных, собранных из семи репрезентативных участков тканей.

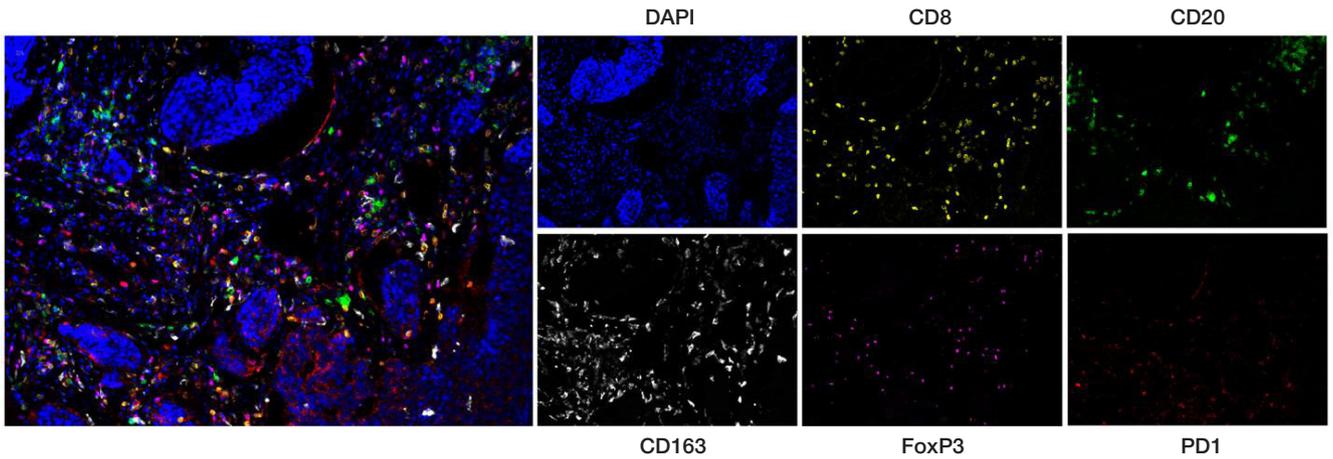


Рис. 1. Микроокружение опухоли при раке легкого. Мультиплексное изображение, увеличение 400×

Плотность инфильтрации цитотоксическими лимфоцитами CD8<sup>+</sup>, В-лимфоцитами CD20<sup>+</sup>, макрофагами CD163<sup>+</sup>, ассоциированными с опухолью и регуляторными Т-лимфоцитами FoxP3<sup>+</sup> была количественно определена в опухолевой ткани пациентов с раком легких (рис. 1). Результаты были представлены в виде процента каждого типа клеток от общего количества клеток в строме опухоли. Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Prism 10 (GraphPad, США). Для выявления различий количества иммунных клеток в микроокружении опухоли использовали критерий Фридмана, для сравнения независимых групп — непараметрический критерий Манна–Уитни. Однофакторный и многофакторный Соx-регрессионный анализ использовали для выявления ассоциации основных клинико-патологических параметров и параметров микроокружения опухоли с выживаемостью без прогрессии пациентов. Все критерии были двухсторонние, различия считали достоверными при значении  $p < 0,05$ .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В микроокружении опухоли НМРЛ медиана доли PD-1-позитивных клеток составила 1,04% (0,17–1,70%), при мелкоклеточном раке легкого (МРЛ) — 0,27% (0,03–2,93%). Частота встречаемости PD-1-позитивных цитотоксических лимфоцитов CD8<sup>+</sup> составила 83,3% (10/12) у пациентов с

НМРЛ и 37,5% (3/8) у пациентов с МРЛ. В то время как частота PD-1-позитивных В-лимфоцитов CD20<sup>+</sup> составляла 8,3% (1/12) и 12,5% (1/8), PD-1-позитивных Т-регуляторных лимфоцитов FoxP3<sup>+</sup> составляла 25% (3/12) и 12,5% (1/8), а PD-1-позитивных макрофагов CD163<sup>+</sup> — 25% (3/12) и 20% (2/8) соответственно. Мы изучили долю PD-1-позитивных цитотоксических лимфоцитов В-лимфоцитов CD8<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, Т-регуляторных лимфоцитов FoxP3<sup>+</sup> и макрофагов CD163<sup>+</sup>, а также долю других PD-1-позитивных клеток (без определения иммунофенотипа) в опухолевом микроокружении пациентов с немелкоклеточным и мелкоклеточным раком легкого (рис. 2).

При оценке клеточной фракции среди всех клеток в иммунном инфильтрате НМРЛ среди лимфоцитов преобладали PD-1-позитивные CD8<sup>+</sup>-цитотоксические лимфоциты и другие PD-1-позитивные иммунные клетки, составляя 0,24% (диапазон: 0,08–0,46%) и 0,39% (диапазон: 0,00–1,05%) соответственно. В микроокружении МКРЛ не наблюдалось существенных различий в количестве иммунных клеток, экспрессирующих PD-1. Также были определены доли клеток, экспрессирующих PD-1, среди всех изученных иммунофенотипов как для НМРЛ, так и для МКРЛ (табл. 1).

При сравнении доли клеток, экспрессирующих PD-1, между пациентами с НМРЛ и МРЛ существенных различий не выявлено (рис. 3).

При анализе параметров иммунного микроокружения с учетом клинических и патологических параметров

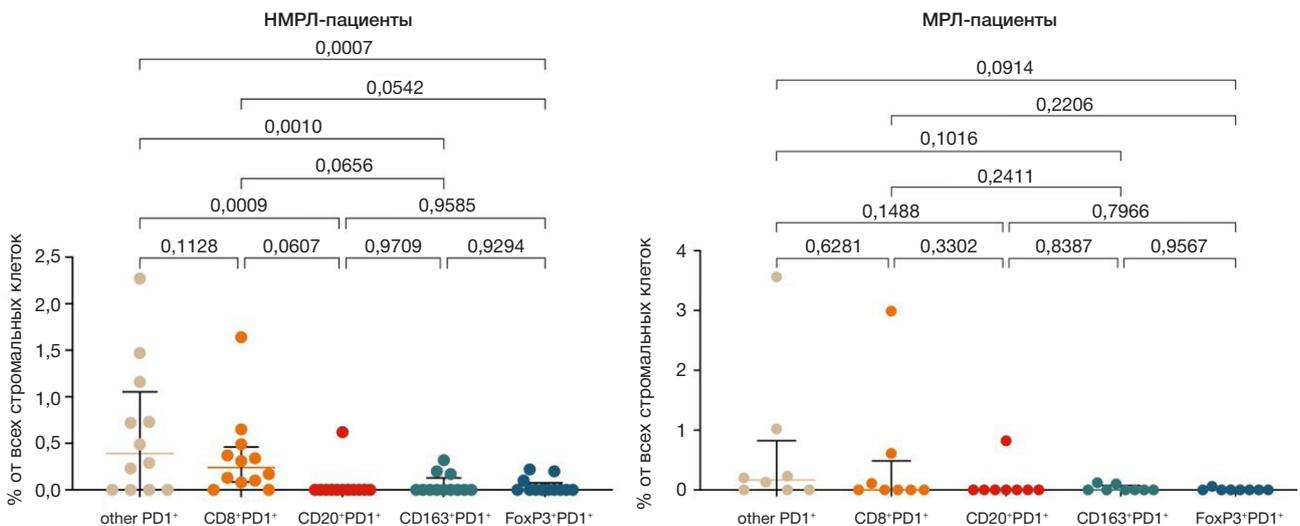


Рис. 2. Доля PD-1-позитивных цитотоксических CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD20<sup>+</sup>-В-лимфоцитов, FoxP3<sup>+</sup>-Т-регуляторных лимфоцитов и CD163<sup>+</sup>-макрофагов, а также других PD-1-позитивных клеток (без определения иммунофенотипа) в микроокружении опухоли у пациентов с НМРЛ и МРЛ

Таблица 1. Доля клеток, экспрессирующих PD-1, среди всех клеток исследуемого иммунофенотипа у пациентов с раком легких, медиана (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Параметр	НМРЛ		МРЛ	
	Медиана (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	p-значения	Медиана (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	p-значения
1. CD8 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	5,20 (1,15-35,33)	$p_{1-2} = 0,0005$ $p_{1-3} = 0,0006$ $p_{1-4} = 0,0010$	0,00 (0,00-12,02)	$p_{1-2} = 0,0527$ $p_{1-3} = 0,0547$ $p_{1-4} = 0,0381$
2. CD20 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	0,00 (0,00-0,00)	$p_{2-3} = 0,9465$ $p_{2-4} = 0,8265$	0,00 (0,00-0,00)	$p_{2-3} = 0,9864$ $p_{2-4} = 0,8784$
3. CD163 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	0,00 (0,00-1,05)	$p_{3-4} = 0,8791$	0,00 (0,00-0,87)	$p_{3-4} = 0,8650$
4. FoxP3 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	0,00 (0,00-1,07)		0,00 (0,00-0,00)	

рака легких не выявлено значимых корреляций между исследуемыми популяциями клеток и возрастом пациента, статусом курения или наличием отдаленных метастазов (стадия M1). Однако статистически значимая связь наблюдалась между стадией заболевания и долей CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с МРЛ. В частности, у пациентов с III-IV стадией заболевания обнаружено снижение доли CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в микроокружении опухоли по сравнению с пациентами со II стадией (3,49% [диапазон: 3,07-1,19%] против 4,82% [диапазон: 3,76-9,88%],  $p = 0,0286$ ). Кроме того, оценена связь между характеристиками микроокружения опухоли и отдаленными результатами лечения с помощью регрессионного анализа Кокса (табл. 2).

Повышенная доля CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов в микроокружении опухоли была выявлена как более значимый независимый фактор, связанный с плохой выживаемостью без прогрессирования у пациентов с раком легких (HR = 0,17 [0,02-0,65],  $p = 0,0454$ ), по сравнению с такими факторами, как стадия, гистологический тип, статус курения, наличие метастазов в региональных лимфатических узлах и отдаленных метастазов (стадия M1). Кроме того, анализ прогностической ценности популяций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, с учетом клинико-патологических параметров показал, что независимые предикторы более короткой выживаемости без прогрессирования при раке легких включают наличие отдаленных метастазов (стадия M1), высокую долю CD163<sup>+</sup>-макрофагов, экспрессирующих PD-1, и низкую долю FoxP3<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1 (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клиническое значение экспрессии PD-1, особенно в контексте иммунотерапии, остается плохо изученным. В литературе доступны ограниченные и противоречивые данные о прогностической ценности определения

экспрессии PD-1. Так, описано, что пациенты с ранней стадией НМРЛ, у которых экспрессия PD-1 составляла  $\geq 10\%$  на лимфоцитах, инфильтрирующих опухоль, имели неблагоприятные показатели 10-летней выживаемости [6]. По другим данным, положительная экспрессия PD-1 в сочетании с высоким количеством лимфоцитов (CD3, CD4, CD8 и FOXP3) была связана со значительно лучшими показателями выживаемости по сравнению с отрицательной экспрессией PD-1 в сочетании с более низким количеством лимфоцитов [7]. В нашем исследовании мы оценили экспрессию PD-1, учитывая иммунофенотип клеток. Мы сосредоточились на четырех наиболее значимых популяциях, для которых есть доказательства, предполагающие связь с ответом на иммунотерапию, поскольку пациенты, включенные в наше исследование, являются потенциальными кандидатами на анти-PD-1-терапию в последующих линиях терапии. Говоря о значимости экспрессии PD-1 для прогноза уже на фоне иммунотерапии, следует упомянуть работу, в которой показано, что низкая частота экспрессии PD-1 среди CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов была отличительной чертой пациентов, прошедших лечение ниволумабом, и это также было связано с клиническими преимуществами и более продолжительной выживаемостью без прогрессирования (HR = 4,51; 95% ДИ: 1,45-13,94) [8]. В нашем исследовании экспрессия PD-1 была обнаружена преимущественно на CD8<sup>+</sup>-лимфоцитах, хотя доля PD-1<sup>+</sup>-клеток в популяции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов составляла около 5% и не была связана с выживаемостью без прогрессии. Известно, что эффекторная функция постепенно утрачивается при прогрессирующем истощении Т-клеток. В недавно опубликованном исследовании была отмечена обратная корреляция между функцией Т-клеток и уровнем экспрессии PD-1 [9]. Таким образом, экспрессия PD-1 на цитотоксических лимфоцитах указывает на состояние истощения. Важно отметить, по полученным

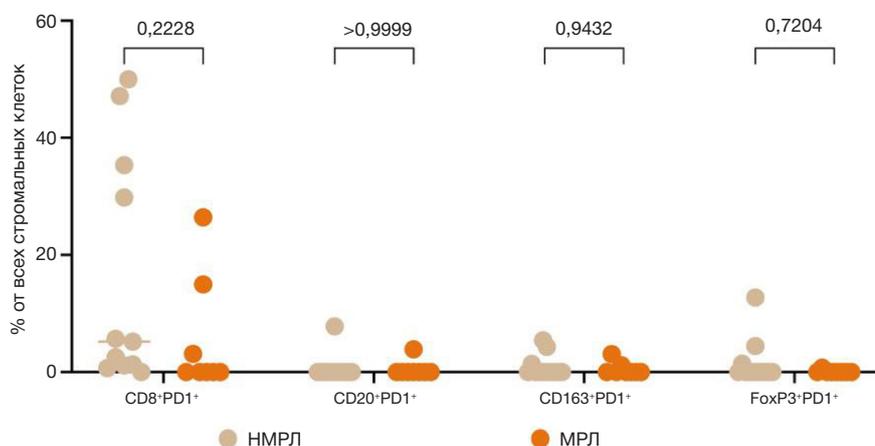


Рис. 3. Сравнение доли клеток, экспрессирующих PD-1, между пациентами с НМРЛ и МРЛ

**Таблица 2.** Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ значимости клинико-патологических параметров и популяций иммунных клеток в продолжительности выживаемости без прогрессирования у пациентов с раком легкого

Параметр	Однофакторный			Многофакторный		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Курение	1,23	0,37–4,75	0,7366	0,4716	0,07–3,12	0,4167
Гистотип	0,83	0,24–2,93	0,7659	1,236	0,15–9,33	0,8365
Стадия	1,4	0,69–3,16	0,367	0,6977	0,11–4,17	0,6798
Стадия T	1,29	0,71–2,44	0,4074	1,54	0,69–4,14	0,3158
Стадия M1	0,79	0,23–3,11	0,7177	0,07	0,001–1,13	0,1158
CD8	1,01	0,86–1,17	0,8213	1,58	0,91–4,00	0,237
CD20	0,42	0,09–0,88	0,1532	0,17	0,02–0,65	0,0454
CD163	1	0,84–1,16	0,9954	1	0,78–1,29	0,9392
FoxP3	0,89	0,69–1,11	0,3567	0,6	0,20–1,25	0,2925

нами данным, иммунные клетки, экспрессирующие PD-1, чрезвычайно редки в микроокружении как НМРЛ, так и МРЛ. Это указывает на то, что большинство иммунных клеток в строме опухоли находится преимущественно в активном функциональном состоянии. Наши результаты показывают, что клетки, на которые нацелены анти-PD-1 терапевтические антитела, немногочисленны в микроокружении опухоли и в основном состоят из цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих PD-1. Блокирование контрольной точки в этих немногих клетках может потенциально восстановить их истощенную функцию. В то же время небольшое количество этих клеток может объяснить ограниченные терапевтические эффекты, наблюдаемые при использовании анти-PD-1-терапии.

В настоящее время мы не можем оценить корреляцию между конкретными характеристиками клеточного состава микроокружения опухоли и результатами лечения у этих пациентов, поскольку их терапия все еще продолжается. Тем не менее, это исследование позволило нам оценить связь между различными параметрами микроокружения опухоли и выживаемостью без прогрессирования (PFS). Наши результаты подчеркивают решающую важность состава иммунных клеток в микроокружении опухоли для определения PFS у пациентов с раком легких. В частности, повышенная доля CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов была идентифицирована как значимый независимый предиктор более плохой PFS, показывающий отношение рисков (HR) 0,17 (95% ДИ: 0,02–0,65,  $p = 0,0454$ ). Эта связь представляется более существенной, чем обычные прогностические факторы, включая стадию опухоли,

гистологический подтип, статус курения и наличие региональных или отдаленных метастазов (стадия M1). Результаты показывают, что инфильтрация В-клеток может играть ранее недооцененную роль в прогрессировании рака легких, возможно, из-за ее влияния на подавление или модуляцию иммунитета в опухолевом микроокружении. Необходимы дальнейшие исследования для изучения функционального воздействия CD20<sup>+</sup>-лимфоцитов на рак легких с целью выяснения их роли в биологии опухоли и устойчивости к эффективному лечению.

Более того, проведенный нами анализ, касающийся популяций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, обнаружил новые данные о связях между экспрессией иммунных контрольных точек и клиническими результатами. Так, наличие отдаленных метастазов (стадия M1), высокая доля CD163<sup>+</sup>-макрофагов, положительных по PD-1, и низкая доля FoxP3<sup>+</sup>-лимфоцитов, положительных по PD-1, были идентифицированы как предикторы более короткой выживаемости без прогрессии. Эти наблюдения подчеркивают сложность иммунной регуляции в опухолевом микроокружении, где тонкий баланс между популяциями иммуносупрессивных и иммуностимулирующих клеток критически влияет на прогрессирование заболевания. Связь PD-1<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup>-макрофагов с плохими результатами лечения преимущественно наблюдалась в моделях на животных [10]. Напротив, противоопухолевый эффект, наблюдаемый в PD-1<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>-лимфоцитах, предполагает потенциальную регуляторную функцию, хотя наличие Treg-лимфоцитов, как правило, связано с плохими результатами [11]. Эти результаты имеют существенное значение для разработки прогностических биомаркеров

**Таблица 3.** Однофакторный и многофакторный регрессионный анализ влияния клинико-патологических параметров и популяций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, на продолжительность выживаемости без прогрессирования у пациентов с раком легких

Параметр	Однофакторный			Многофакторный		
	HR	95% CI	P value	HR	95% CI	P value
Курение	1,23	0,37–4,75	0,7366	3,85	0,33–125,70	0,3402
Гистотип	0,83	0,24–2,93	0,7659	4	0,06–186,10	0,481
Стадия	1,4	0,69–3,16	0,367	2,32	0,30–71,80	0,549
Стадия T	1,29	0,71–2,44	0,4074	0,8	0,17–2,81	0,7545
Стадия M1	0,79	0,23–3,11	0,7177	0,004	0,0003–0,26	0,0349
%CD8 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	1,011	0,97–1,04	0,5361	1,019	0,93–1,11	0,6532
%CD20 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	0,001	–	>0,9999	0,001	–	>0,9999
%CD163 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	1,39	0,95–1,97	0,0619	4,78	1,35–33,64	0,041
%FoxP3 <sup>+</sup> PD1 <sup>+</sup>	1,06	0,85–1,22	0,4517	0,44	0,16–0,89	0,0484

и формулирования иммунотерапевтических стратегий при лечении рака легких. Идентификация субпопуляций иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, в качестве прогностических маркеров подчеркивает необходимость более глубокого понимания функционирования опухолевого микроокружения. Нацеливание на обнаруженные популяции, либо посредством прямой модуляции, либо в сочетании с существующими ингибиторами иммунных контрольных точек, может проложить путь к улучшению терапевтических результатов. Тем не менее, функциональная гетерогенность в этих популяциях клеток требует более подробных механистических исследований для выяснения их роли в иммунитете опухоли и определения оптимальных терапевтических целей.

## ВЫВОДЫ

Проведенное исследование предоставляет убедительные доказательства того, что иммунный ландшафт опухолевого микроокружения, в частности состав иммунных клеток, экспрессирующих PD-1, в значительной степени связан с результатами лечения рака легких. Эти результаты подчеркивают критическую важность иммунного контекста в определении прогноза клинического течения и разработке терапевтических стратегий. Будущие исследования должны быть сосредоточены на подтверждении этих результатов на более крупных независимых когортах пациентов и дальнейшем изучении их прогностического потенциала в отношении иммунотерапии при раке легких.

## Литература

- Hynds RE, Frese KK, Pearce DR, Grönroos E, Dive C, Swanton C. Progress towards non-small-cell lung cancer models that represent clinical evolutionary trajectories. *Open Biol.* 2021; 11 (1): 200247. DOI: 10.1098/rsob.200247.
- Thommen DS, Schreiner J, Müller P, Herzig P, Roller A, Belousov A, et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer immunology research.* 2015; 3: 1344–55. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0097.
- Enfield KSS, Collier E, Lee C, Magness A, Moore DA, Sivakumar M, et al. Spatial Architecture of Myeloid and T Cells Orchestrates Immune Evasion and Clinical Outcome in Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2024; 14 (6): 1018–47. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-23-1380.
- Lin Z, Gu J, Cui X, Huang L, Li S, Feng J et al. Deciphering Microenvironment of NSCLC based on CD8<sup>+</sup> TIL Density and PD-1/PD-L1 Expression. *J Cancer.* 2019; 10 (1): 211–22. DOI:10.7150/jca.26444.
- Wu J, Wang Y, Huang Z, Wu J, Sun H, Zhou R, et al. Tumor microenvironment assessment-based signatures for predicting response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. *iScience.* 2024; 27 (12): 111340. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111340.
- Dan A, Aricak O, Rounis K, Montero-Fernandez MA, Guijarro R, Ekman S. et al. PD-1 expression in tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer.

- Front Oncol. 2024; 14: 1414900. DOI: 10.3389/fonc.2024.1414900.
- Sun C, Zhang L, Zhang W, Liu Y, Chen B, Zhao S, et al. Expression of PD-1 and PD-L1 on Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicts Prognosis in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *OncoTargets and Therapy.* 2020; 13: 6475–83. Available from: <https://doi.org/10.2147/OTT.S252031>.
- Mazzaschi G, Madeddu D, Falco A, Bocchialini G, Goldoni M, Sogni F et al. Low PD-1 Expression in Cytotoxic CD8<sup>+</sup> Tumor-Infiltrating Lymphocytes Confers an Immune-Privileged Tissue Microenvironment in NSCLC with a Prognostic and Predictive Value. *Clin Cancer Res.* 2018; 24 (2): 407–19. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2156.
- Kansy BA, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Shayan G, Lei Y, et al. PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2017; 77: 6353–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3167.
- Chen L, Cao MF, Xiao JF, Ma QH, Zhang H, Cai RL, et al. Stromal PD-1+ tumor-associated macrophages predict poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2020; 97: 68–79. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.12.007.
- Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012; 75 (1): 95–101. DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.06.002.

## References

- Hynds RE, Frese KK, Pearce DR, Grönroos E, Dive C, Swanton C. Progress towards non-small-cell lung cancer models that represent clinical evolutionary trajectories. *Open Biol.* 2021; 11 (1): 200247. DOI: 10.1098/rsob.200247.
- Thommen DS, Schreiner J, Müller P, Herzig P, Roller A, Belousov A, et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer immunology research.* 2015; 3: 1344–55. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0097.
- Enfield KSS, Collier E, Lee C, Magness A, Moore DA, Sivakumar M, et al. Spatial Architecture of Myeloid and T Cells Orchestrates Immune Evasion and Clinical Outcome in Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2024; 14 (6): 1018–47. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-23-1380.
- Lin Z, Gu J, Cui X, Huang L, Li S, Feng J et al. Deciphering Microenvironment of NSCLC based on CD8<sup>+</sup> TIL Density and PD-1/PD-L1 Expression. *J Cancer.* 2019; 10 (1): 211–22. DOI:10.7150/jca.26444.
- Wu J, Wang Y, Huang Z, Wu J, Sun H, Zhou R, et al. Tumor microenvironment assessment-based signatures for predicting response to immunotherapy in non-small cell lung cancer. *iScience.* 2024; 27 (12): 111340. DOI: 10.1016/j.isci.2024.111340.
- Dan A, Aricak O, Rounis K, Montero-Fernandez MA, Guijarro R, Ekman S. et al. PD-1 expression in tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer.

- Front Oncol. 2024; 14: 1414900. DOI: 10.3389/fonc.2024.1414900.
- Sun C, Zhang L, Zhang W, Liu Y, Chen B, Zhao S, et al. Expression of PD-1 and PD-L1 on Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicts Prognosis in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *OncoTargets and Therapy.* 2020; 13: 6475–83. Available from: <https://doi.org/10.2147/OTT.S252031>.
- Mazzaschi G, Madeddu D, Falco A, Bocchialini G, Goldoni M, Sogni F et al. Low PD-1 Expression in Cytotoxic CD8<sup>+</sup> Tumor-Infiltrating Lymphocytes Confers an Immune-Privileged Tissue Microenvironment in NSCLC with a Prognostic and Predictive Value. *Clin Cancer Res.* 2018; 24 (2): 407–19. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2156.
- Kansy BA, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Shayan G, Lei Y, et al. PD-1 Status in CD8(+) T Cells Associates with Survival and Anti-PD-1 Therapeutic Outcomes in Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2017; 77: 6353–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3167.
- Chen L, Cao MF, Xiao JF, Ma QH, Zhang H, Cai RL, et al. Stromal PD-1+ tumor-associated macrophages predict poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 2020; 97: 68–79. DOI: 10.1016/j.humpath.2019.12.007.
- Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012; 75 (1): 95–101. DOI: 10.1016/j.lungcan.2011.06.002.

## ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАСТАЗ-АССОЦИИРОВАННЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ КЛЕТОК ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ОСОБЕННОСТИ ПАРАМЕТРОВ БОКОВОГО СВЕТОРАССЕЙЯНИЯ

А. В. Бузенкова<sup>1</sup>✉, Е. С. Григорьева<sup>1</sup>, В. В. Алифанов<sup>1</sup>, Л. А. Таширева<sup>1</sup>, О. Е. Савельева<sup>3</sup>, Е. С. Пудова<sup>1</sup>, М. В. Завьялова<sup>2</sup>, Н. В. Чердынцева<sup>1</sup>, В. М. Перельмутер<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Детекция циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), находящихся в терминальной стадии эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), затруднена, поскольку они не экспрессируют или имеют слабую экспрессию эпителиальных маркеров. Это осложняет изучение их прогностического потенциала. Показано, что циркулирующие клетки (ЦК) с фенотипом CD45-EpCAM<sup>+</sup>CK7/8-CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> ассоциированы с риском метастазирования при раке молочной железы (РМЖ). Целью исследования было изучить ЦК в зависимости от параметров бокового светорассеяния, с учетом экспрессии маркеров эпителиальности и CD11b. У 11 доноров и 20 пациенток с РМЖ методом проточной цитометрии проводили оценку фенотипов ЦК в областях с низким (SSC<sup>low</sup>) и высоким (SSC<sup>high</sup>) боковым светорассеянием. Все CD45-EpCAM<sup>+</sup>CK7/8-CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> ЦК были представлены фенотипами CD11b<sup>-</sup> и CD11b<sup>+</sup>, которые встречались как в SSC<sup>low</sup>, так и в SSC<sup>high</sup> областях. Из восьми обнаруженных у пациенток фенотипов CD45-EpCAM<sup>+</sup>CK7/8-CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> ЦК с разными вариантами коэкспрессии эпителиальных маркеров (E-cadherin, panCK, и icEpCAM) и CD11b, шесть имели признаки эпителиальности по одному из маркеров, еще два не имели признаков эпителиальности и преобладали над прочими (у доноров встречались только такие два фенотипа). Различие параметров светорассеяния ЦК с одинаковыми фенотипами является дополнительной характеристикой, прогностическое значение которой предстоит выяснить. Экспрессия E-cadherin и panCK при отсутствии mEpCAM и наличие icEpCAM позволяют полагать, что часть ЦК являются опухолевыми в состоянии выраженного ЭМП. ЦК, коэкспрессирующие CD11b и эпителиальные маркеры, могут возникать вследствие гибридизации с миелоидными клетками.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, циркулирующие клетки, проточная цитометрия, боковое светорассеяние

**Финансирование:** работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-15-00135.

**Вклад авторов:** А. В. Бузенкова — анализ литературы, анализ данных, получение и статистическая обработка результатов, написание статьи; Е. С. Григорьева — проточная цитометрия, анализ данных, интерпретация результатов, написание статьи; В. В. Алифанов — проточная цитометрия, редактирование статьи; Л. А. Таширева, О. Е. Савельева — обсуждение результатов, редактирование статьи; Е. С. Пудова — проточная цитометрия; М. В. Завьялова — редактирование статьи; Н. В. Чердынцева — планирование, дизайн исследования, обсуждение результатов; В. М. Перельмутер — планирование и руководство исследованием, интерпретация результатов, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол № 8 от 17 июня 2016 г.), проведено в соответствии с федеральными законами Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларацией 1964 г. и всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериале, полученном у людей. Все участники подписали добровольное информированное согласие об участии в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ангелина Владиславовна Бузенкова  
пер. Кооперативный, д. 5, г. Томск, 634009, Россия; buzenkova\_av@mail.ru

**Статья получена:** 11.03.2025 **Статья принята к печати:** 26.03.2025 **Опубликована онлайн:** 18.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.019

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## CHARACTERISTICS OF THE METASTASIS-ASSOCIATED CIRCULATING CELLS: FEATURES OF SIDE SCATTER PARAMETERS

Buzenkova AV<sup>1</sup>✉, Grigoryeva ES<sup>1</sup>, Alifanov VV<sup>1</sup>, Tashireva LA<sup>1</sup>, Savelieva OE<sup>3</sup>, Pudova ES<sup>1</sup>, Zavyalova MV<sup>2</sup>, Cherdyntseva NV<sup>1</sup>, Perelmuter VM<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup> Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

It is difficult to detect the circulating tumor cells (CTCs) being through the epithelial-mesenchymal transition (EMT) terminal phase, since these do not express epithelial markers or show weak expression of those. This hampers assessment of the CTC prognostic potential. It has been shown that the circulating cells (CCs) with the CD45-EpCAM<sup>+</sup>CK7/8-CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> phenotype are associated with the risk of metastasis in breast cancer (BC). The study aimed to test CCs based on the side scatter parameters considering the expression of epithelial cell markers and CD11b. CC phenotypes were assessed by flow cytometry within the regions with low (SSC<sup>low</sup>) and high (SSC<sup>high</sup>) side scatter in 11 donors and 20 female patients with BC. All the CD45-EpCAM<sup>+</sup>CK7/8-CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> CCs were represented by the CD11b<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup> phenotypes found in both SSC<sup>low</sup> and SSC<sup>high</sup> regions. Among eight CD45-EpCAM<sup>+</sup>CK7/8-CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> CC phenotypes with different variants of co-expression of epithelial markers (E-cadherin, panCK, and icEpCAM) and CD11b found in patients, six showed signs of epithelial nature based on one of the markers, while another two showed no epithelial traits and predominated over other phenotypes (only these two phenotypes were found in donors). The differences in light scattering parameters of the CCs with the same phenotype is one more characteristic, the prognostic value of which remains to be uncovered. The E-cadherin and panCK expression in the absence of mEpCAM and presence of icEpCAM suggest that some CCs are tumor cells in the state of pronounced EMT. CCs showing co-expression of CD11b and epithelial markers can emerge due to hybridization with myeloid cells.

**Keywords:** breast cancer, circulating cells, flow cytometry, side scatter

**Funding:** the study was supported by the RSF grant No. № 23-15-00135.

**Author contribution:** Buzenkova AV — literature review, data analysis, acquisition and statistical processing of the results, manuscript writing; Grigoryeva ES — flow cytometry, data analysis, interpretation of the results, manuscript writing; Alifanov VV — flow cytometry, manuscript editing; Tashireva LA, Savelieva OE — discussion, manuscript editing; Pudova ES — flow cytometry; Zavyalova MV — manuscript editing; Cherdyntseva NV — study planning and design, discussion; Perelmuter VM — study planning and management, interpretation of the results, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (protocol No. 8 dated 17 June 2016) and conducted in accordance with Federal Laws of the Russian Federation (No. 152, 323, etc.), the Declaration of Helsinki (1964) and all later amendments and additions that regulate scientific research involving human biomaterial. All subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Angelina V. Buzenkova  
Kooperativny per., 5, Tomsk, 634009, Russia; buzenkova\_av@mail.ru

**Received:** 11.03.2025 **Accepted:** 26.03.2025 **Published online:** 18.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.019

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Гематогенное метастазирование — основная причина неблагоприятного исхода злокачественных новообразований. Источником гематогенных метастазов являются клетки первичной опухоли, обладающие способностью к интравазации и образованию циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК). Классический метод определения ЦОК CELLSEARCH основан на выделении CD45-отрицательных, EpCAM-положительных и цитokerатин 8-, 18- и/или 19-положительных ЦОК в периферической крови [1]. К настоящему времени разработаны разные технологии обнаружения и выделения ЦОК: разделение центрифугированием в градиенте плотности; диэлектрофорез (метод выделения ЦОК на основе их диэлектрических свойств); метод разделения клеток на основе микрофлюидных чипов; обогащение ЦОК с использованием системы сортировки клеток с магнитной активацией (включает маркировку ЦОК суперпарамагнитными микросферами MACS, покрытыми антителами, специфичными для поверхностных антигенов ЦОК); использование магнитных бусин, покрытых тонким слоем гидрогеля, содержащего антитела против EpCAM; метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР); методы обнаружения, основанные на проточной цитометрии [2]. У пациентов на поздней стадии рака молочной железы ЦОК обнаруживают в 60% случаев, на ранних стадиях — в 20–30% случаев [3]. Использование метода проточной цитометрии позволяет выявить широкий спектр функциональных маркеров на каждой из ЦОК. Благодаря этой технологии при РМЖ продемонстрирована гетерогенность проявлений признаков стволовости и проявлений эпителиально-мезенхимального перехода [4, 5]. Выживаемость без прогрессирования связана при РМЖ с ЦОК. При количестве ЦОК  $\geq 6$  чаще возникают рецидивы и метастазы и уменьшается выживаемость [6]. Ранее нами были опубликованы данные о том, что наряду с классическими ЦОК, экспрессирующими мембранный EpCAM (mEpCAM) в крови, имеются клетки с фенотипом CD45<sup>-</sup>mEpCAM<sup>-</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup>, которые ассоциированы с повышенным риском метастазирования [7]. Эти клетки, в отличие от ЦОК обозначены как циркулирующие клетки (ЦК). Их природа остается неясной.

Важными характеристиками любой клетки в кровотоке, в том числе и опухолевой, являются биофизические параметры, которые могут частично отражать ее морфофункциональное состояние. Измерение биофизических свойств клеток (таких как электрический импеданс, радиочастотная проводимость, рассеяние света клетками под различными углами) положено в основу методов автоматизированного гематологического анализа. Метод проточной цитометрии позволяет получить информацию относительно размера и структуры клеток посредством детекции параметров прямого и бокового светорассеяния. При прохождении клетки через испускаемый лазером световой поток регистрируется флуоресценция клеток и светорассеяние в различных направлениях. Прямое светорассеяние (FSC) учитывает интенсивность света, рассеянного под малым углом до 10° (детекторы расположены по ходу лазерного луча), и характеризует размер клетки. Боковое светорассеяние (SSC) учитывает интенсивность света, рассеянного до 90° (детекторы расположены перпендикулярно направлению лазерного луча), зависит от плотности клетки и характеризует сложность внутриклеточных структур [8] и выраженность цитоплазматической зернистости

[9]. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о более тонком влиянии различных структур клетки на параметры бокового светорассеяния. Так, рассеивание света под углом 5–30° обусловлено клеточным ядром, а под углом 50–130° — небольшими органеллами, такими как митохондрии, пероксисомы, лизосомы и гранулы [10].

В 2023 г. разработан метод и представлены результаты, демонстрирующие, что оцененная с помощью SSC гранулярность клеток может быть использована для разделения функциональных субпопуляций лимфоцитов. Так, наивные недифференцированные лимфоциты располагаются в области SSC<sup>low</sup>, а цитотоксические лимфоциты с большим содержанием гранул — в SSC<sup>high</sup> [9].

Цель данной работы заключалась в уточнении фенотипических характеристик CD45<sup>-</sup>mEpCAM<sup>-</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> клеток в крови пациенток с раком молочной железы в зависимости от бокового светорассеяния SSC, с учетом экспрессии маркеров эпителиальности E-cadherin, цитокератинов AE1/AE3 (pan Cytokeratin), а также внутриклеточной экспрессии молекулы адгезии EpCAM (icEpCAM) у пациенток с инвазивной протоковой карциномой молочной железы неспецифического типа (ИПКНТ) и доноров.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование вошли 11 доноров и 20 пациенток с ИПКНТ, проходивших лечение в НИИ онкологии Томского НИМЦ. Критерии включения пациенток в группу исследования: диагноз инвазивной протоковой карциномы молочной железы неспецифического типа, подтвержденный морфологически; распространенность первичной опухоли T<sub>1</sub>-4N<sub>0</sub>-3M<sub>0</sub>; люминальный B Her2<sup>-</sup> (9 пациенток), люминальный B Her2<sup>+</sup> (4 пациентки), трижды негативный (5 пациенток) и HER2<sup>+</sup> (2 пациентки) молекулярно-биологические подтипы. Критерии исключения пациенток из группы исследования: другие гистологические типы рака молочной железы; первично множественные злокачественные опухоли; хронические воспалительные заболевания в стадии обострения. Группа доноров была сопоставима с пациентками по возрасту, главным критерием включения являлось отсутствие хронических воспалительных заболеваний в стадии обострения. Образцы венозной крови забирали в вакуумные пробирки, обработанные ЭДТА, перед операцией и неоадьювантной химиотерапией (НАХТ). Дальнейшую пробоподготовку осуществляли согласно протоколу, описанному ранее [11]. Для окрашивания поверхностных маркеров использовали моноклональные антитела: BV570-анти-CD45 (клон HI30, мышинные IgG1; Sony Biotechnology, США), PE-Cy7-анти-N-кадгерин (клон 8C11, мышинные IgG1; Sony Biotechnology, США), BV700-анти-CD24 (клон ML5, мышинные IgG2a; BD Horizont, США), R718-анти-EpCAM (CD326) (клон EBA-1, мышинные IgG1; BD Biosciences, США), BV-421-анти-CD11b (клон ICRF44, мышинные IgG1; BioLegend, Великобритания), PE-Dazzle594-анти-E-кадгерин (CD324) (клон 67A4, крысиные IgG1; Sony Biotechnology, США). Для внутриклеточного окрашивания использовали: PE-анти-CK7/8 (клон CAM 5.2, мышинные IgG2a; BD Biosciences, США), eFlour660-анти-panCK (клон AE1/3, мышинные IgG1; Invitrogen, США), BV605-анти-EpCAM (CD326) (клон 9C4, IgG2b; Sony Biotechnology, США). Клетки линии рака молочной железы MCF-7 использовали в качестве положительного контроля при оценке уровня флуоресценции антител против

эпителиальных маркеров, а клетки промоноцитарной клеточной линии U937 — в качестве отрицательного контроля. Позитивными по эпителиальным маркерам считали события, детектируемые в области высокого уровня интенсивности сигнала (седьмая декада и выше).

Иммунофлуоресценцию анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte 3000 (ACEA Biosciences, США) с помощью пакета программ NovoExpress 1.3.0 (ACEA Biosciences, США). Оценку гранулярности обнаруженных клеток проводили исходя из параметра бокового светорассеяния SSC, индивидуально для каждого случая.  $SSC^{low}$ -циркулирующие клетки локализовались на двумерном графике FSC/SSC в области, соответствующей популяциям агранулоцитов (лимфоциты и моноциты).  $SSC^{high}$ -клетки располагались на двумерном графике FSC/SSC в области, соответствующей популяции гранулоцитов. Медианное значение границы между  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$  областями для данного цитометра составило 0,40 (0,36–0,45) (рис. 1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ GraphPadPrism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Для сравнения частот встречаемости различных фенотипов клеток использовали точный критерий Фишера. Для сравнения количества клеточных фенотипов между собой использовали непараметрический критерий Уилкоксона, для сравнения количеств клеточных фенотипов у доноров и пациентов — непараметрический критерий Манна–Уитни; данные представлены как Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ). Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Частота встречаемости и количество ЦК в областях $SSC^{low}$ и $SSC^{high}$ у доноров и пациенток с ИПКНТ

Для уточнения природы ЦК оценивали экспрессию маркера миелоидного происхождения CD11b, а также маркеров эпителиальности: E-cadherin, pan-Cytokeratin и внутриклеточного EpCAM (icEpCAM). Из 16 возможных фенотипов ЦК в цельной крови пациенток с ИПКНТ

обнаруживались восемь. Причем каждая клетка экспрессировала только один из перечисленных эпителиальных маркеров. Было проведено сравнение частот встречаемости (табл. 1) и количества (табл. 2) этих клеточных популяций в зависимости от степени бокового светорассеяния:  $SSC^{low}$  или  $SSC^{high}$ .

В табл. 1 и представлены только те фенотипы клеток, которые были обнаружены в крови пациенток с ИПКНТ. Частота встречаемости клеток с изучаемыми фенотипами ЦК не различалась в областях  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$ . Независимо от параметра SSC и экспрессии CD11b в большинстве случаев (от 85 до 100%) обнаруживали ЦК с фенотипами № 1 и № 5 без экспрессии эпителиальных маркеров. В 20–35% процентах случаев среди ЦК присутствовали E-cadherin<sup>+</sup>-клетки. В шести фенотипах ЦК наблюдали экспрессию одного из исследованных эпителиальных маркеров.

Суммарное количество клеток, экспрессирующих эпителиальные маркеры (независимо от экспрессии CD11b и параметра SSC), составляет 1,9 клеток в 1 мл цельной крови. ЦК с фенотипами № 1 и № 5 не только чаще обнаруживались в крови, но и были самыми многочисленными. Медиана остальных шести фенотипов была близкой к нулю.

Количество ЦК с фенотипом № 5 в области  $SSC^{high}$  было в 24 раза больше, чем в области  $SSC^{low}$  ( $p < 0,0001$ ) (табл. 2). В отличие от пациенток с РМЖ у доноров обнаружено только два фенотипа исследуемых клеток. Стоит отметить, что это те же самые часто встречающиеся и многочисленные фенотипы № 1 и № 5. Частоты встречаемости указанных фенотипов клеток не различались в зависимости от их расположения в областях  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$ , а количество было не одинаковым. Количество клеток с фенотипом № 5 CD11b<sup>+</sup>E-cadherin<sup>+</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup> было в 12,5 раз больше в области  $SSC^{high}$  по сравнению с  $SSC^{low}$  ( $p = 0,0020$ ), а клеток с фенотипом № 1 CD11b<sup>-</sup>E-cadherin<sup>+</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup>, напротив, было в 7,5 раз больше в  $SSC^{low}$ , чем в  $SSC^{high}$  ( $p = 0,0156$ ). Также области в  $SSC^{high}$  количество клеток с фенотипом № 5 CD11b<sup>+</sup>E-cadherin<sup>+</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup> в 25 раз преобладало над клетками с фенотипом № 1 CD11b<sup>-</sup>E-cadherin<sup>+</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup> ( $p = 0,0020$ ) (табл. 3).

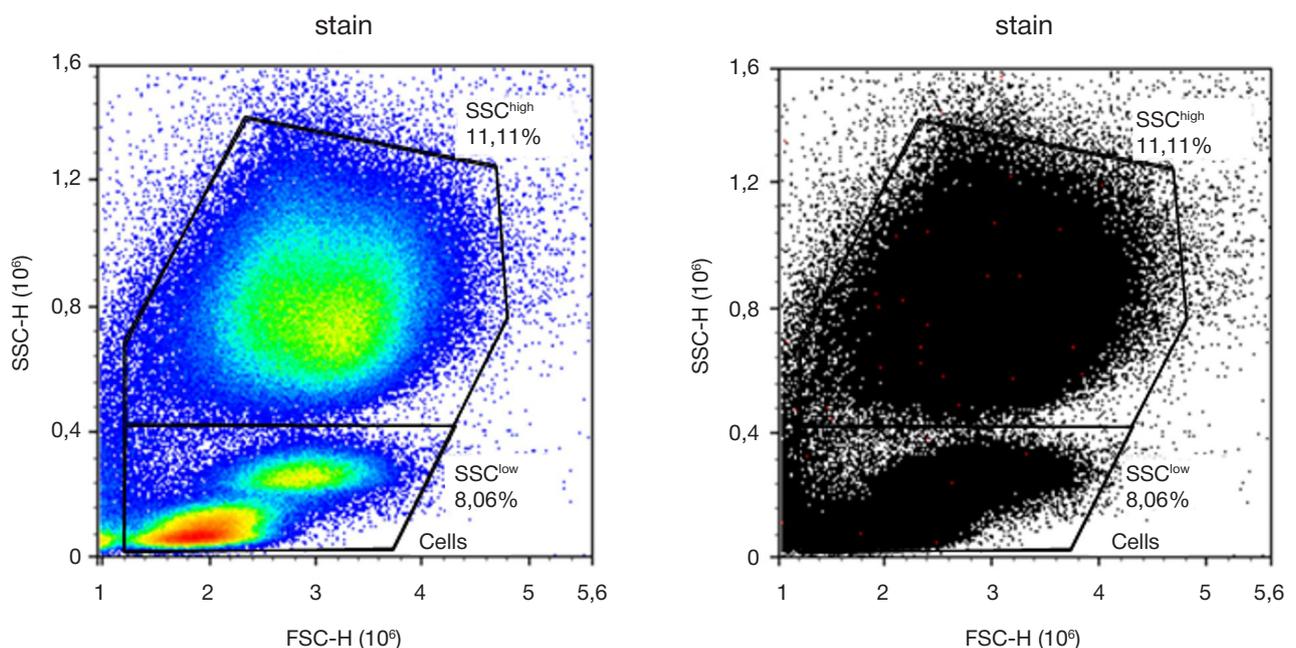


Рис. 1. Распределение ЦК (CD45<sup>+</sup>mEpCAM<sup>+</sup>CK7/8-CD24<sup>-</sup>Ncadh<sup>+</sup>) в областях  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$  (изучаемые клетки обозначены красным цветом)

Таблица 1. Сравнение частоты встречаемости ЦК в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup> у пациенток с ИПКНТ

Фенотип ЦК (CD45 <sup>+</sup> mEpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>-</sup> CD24 <sup>+</sup> Ncadh <sup>-</sup> )	Частота встречаемости, % (абс. знач.)	
	n = 20	
	SSC <sup>low</sup>	SSC <sup>high</sup>
(№1) CD11b <sup>-</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	85 (17/20)	100 (20/20)
(№2) CD11b <sup>-</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>+</sup>	0 (0/20)	10 (2/20)
(№3) CD11b <sup>-</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>+</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	5 (1/20)	10 (2/20)
(№4) CD11b <sup>-</sup> E-cadh <sup>+</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	35 (7/20)	20 (4/20)
(№5) CD11b <sup>+</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	95 (19/20)	100 (20/20)
(№6) CD11b <sup>+</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>+</sup>	10 (2/20)	10 (2/20)
(№7) CD11b <sup>+</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>+</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	10 (2/20)	25 (5/20)
(№8) CD11b <sup>+</sup> E-cadh <sup>+</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	15 (3/20)	25 (5/20)

Примечательно, что у доноров не было ЦК, в которых бы экспрессировались какие-либо из использованных нами маркеров эпителиальных клеток.

### Сравнение частоты встречаемости и количества различных фенотипов ЦК у доноров и пациенток с ИПКНТ

Сравнение частоты встречаемости и количества различных фенотипов ЦК в крови доноров и пациенток с ИПКНТ представляет отдельный интерес в связи с возможностью существования ассоциативной связи между идентификацией в крови ЦК и наличием онкологического заболевания. Было проведено сравнение частоты встречаемости ЦК с фенотипом CD45<sup>+</sup>mEpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>Ncadherin<sup>-</sup> с разными вариантами коэкспрессии CD11b, E-cadherin, pan-Cytokeratin и icEpCAM в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup> (рис. 2). С наибольшей частотой и у доноров, и у пациенток с ИПКНТ в SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup> областях встречались два фенотипа ЦК: № 1 CD11b<sup>-</sup>Ecadherin<sup>-</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup> и № 5 CD11b<sup>+</sup>Ecadherin<sup>-</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup>, т. е. клетки, не экспрессирующие маркеры эпителиальности E-cadherin, pan-Cytokeratin и icEpCAM (рис. 2А, Б). Эти же фенотипы ЦК (№ 1 и 5) оказались не только самыми частыми, но и самыми многочисленными в обеих областях (рис. 2С, Г). Клетки с фенотипом

№ 4 CD45<sup>+</sup>mEpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>Ncadherin<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>Ecadherin<sup>+</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup> в области SSC<sup>low</sup> встречались достоверно чаще ( $p = 0,0331$ ) (рис. 2А) и в большем количестве на уровне тенденции ( $p = 0,0522$ ) (рис. 2В) у пациенток с ИПКНТ по сравнению с донорами. Стоит еще раз подчеркнуть, что у доноров клеток, экспрессирующих маркеры эпителиальности, не было обнаружено вовсе. У пациенток с ИПКНТ ЦК, экспрессирующие маркеры эпителиальности, обнаруживались, однако частота их встречаемости была низкой.

Частота встречаемости клеток, экспрессирующих любые эпителиальные маркеры, в области SSC<sup>low</sup> была выше у пациенток с ИПКНТ, чем у доноров (у доноров таких клеток обнаружено не было) независимо от экспрессии CD11b (соответственно  $p = 0,0331$  и  $p = 0,0331$ ), в SSC<sup>high</sup> — только для CD11b<sup>+</sup>-клеток ( $p = 0,0116$ ) (рис. 3А). Количество таких клеток было больше у пациенток с ИПКНТ по сравнению с донорами только для CD11b<sup>+</sup>-клеток в области SSC<sup>high</sup> ( $p = 0,0129$ ) (рис. 3Б).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

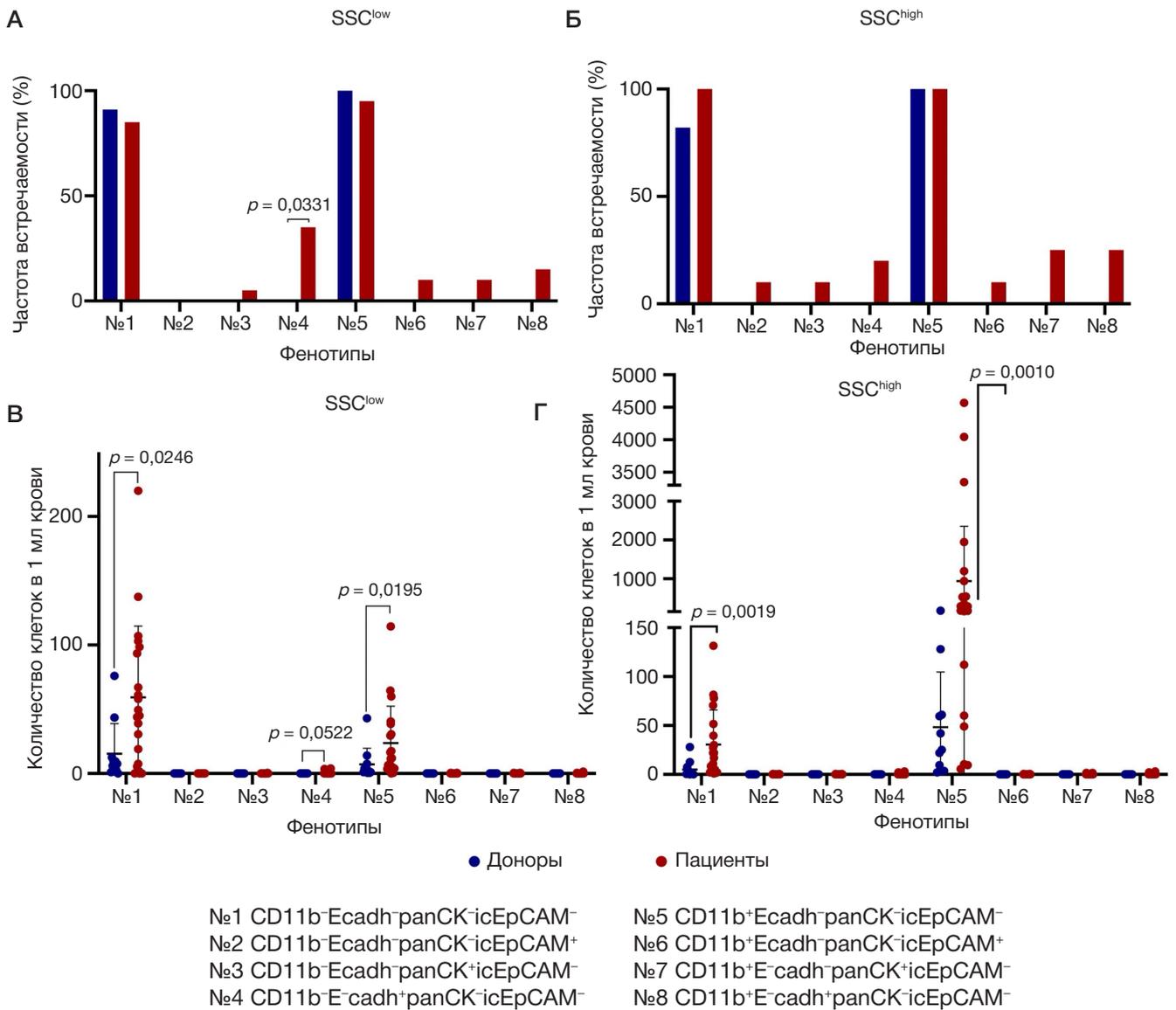
Оценка параметра бокового светорассеяния позволила разделить исследуемые клетки на две популяции, располагающиеся в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup>, различающихся (как следует из физической природы

Таблица 2. Сравнение количеств ЦК в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup> у пациенток с ИПКНТ

Фенотип ЦК (CD45 <sup>+</sup> mEpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>-</sup> CD24 <sup>+</sup> Ncadh <sup>-</sup> )	Количество клеток Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ) / мл		p
	n = 20		
	SSC <sup>low</sup>	SSC <sup>high</sup>	
	a	b	
(№1) CD11b <sup>-</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	47,25 (10,38–97,25)	19,50 (3,13–48,50)	
(№5) CD11b <sup>+</sup> E-cadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	11,75 (5,00–36,50)	287,00 (73,00–1132,00)	$p_{a-b} < 0,0001$

Таблица 3. Сравнение частоты встречаемости и количества ЦК в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup> у доноров

Фенотип ЦК (CD45 <sup>+</sup> mEpCAM <sup>+</sup> CK7/8 <sup>-</sup> CD24 <sup>+</sup> Ncadh <sup>-</sup> )			SSC <sup>low</sup>	SSC <sup>high</sup>	p
			a	b	
(№1) CD11b <sup>-</sup> Ecadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	Частота встречаемости, % (абс. знач.)	1	91 (10/11)	82 (9/11)	
	Количество клеток Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	2	7,50 (1,50–12,50)	1,00 (0,50–7,50)	$p_{a-b} = 0,0156$
(№5) CD11b <sup>+</sup> Ecadh <sup>-</sup> panCK <sup>-</sup> icEpCAM <sup>-</sup>	Частота встречаемости, % (абс. знач.)	3	100 (11/11)	100 (11/11)	
	Количество клеток Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	4	2,00 (1,00–7,50)	25,00 (3,50–61,00)	$p_{a-b} = 0,0020$ ; $p_{2-4} = 0,0020$



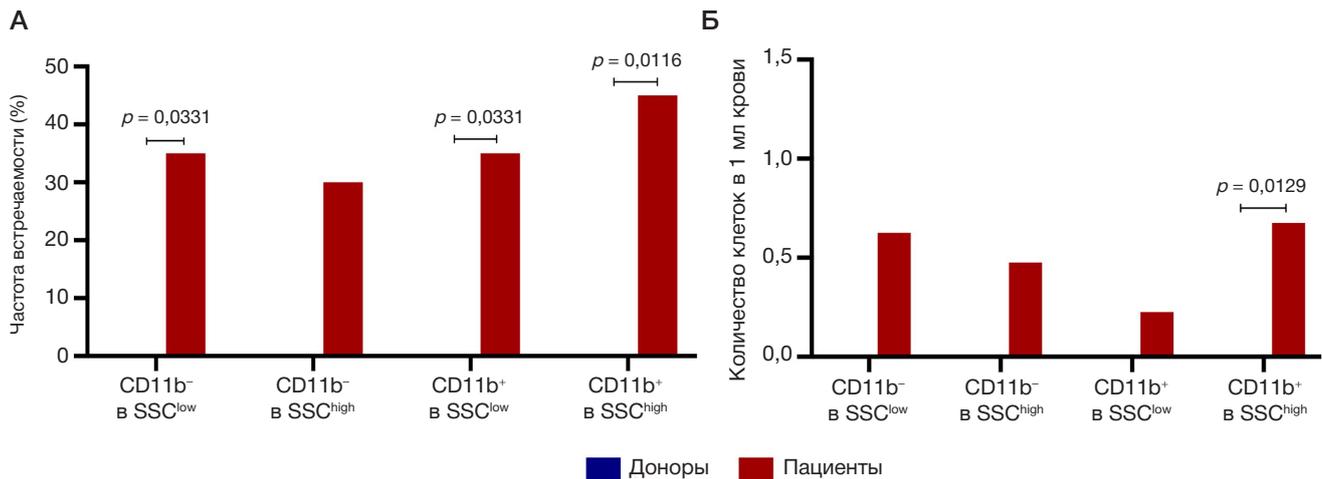
**Рис. 2.** Сравнение частоты встречаемости и количества в крови доноров и пациенток с ИПКНТ ЦК (основной фенотип:  $CD45^+mEpCAM^+CK7/8^+CD24^+Ncadh^-$  — с коэкспрессией  $CD11b$ ,  $E-cadherin$ ,  $pan-Cytokeratin$  и  $icEpCAM$ ) в областях  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$ . **А.** Сравнение частоты встречаемости ЦК у доноров и пациенток в области  $SSC^{low}$ . **Б.** Сравнение частоты встречаемости ЦК у доноров и пациенток в области  $SSC^{high}$ . **В.** Сравнение количества ЦК у доноров и пациенток в области  $SSC^{low}$ . **Г.** Сравнение количества ЦК у доноров и пациенток в области  $SSC^{high}$ .

показателя) сложностью внутриклеточной организации клетки, включая количество органоидов и выраженность цитоплазматической зернистости [8].

Данный критерий, по-видимому, действительно отражает гранулярность цитоплазмы, так как количество клеток в областях  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$  зависело от экспрессии в клетках миелоидного маркера  $CD11b$ . Количество ЦК с фенотипом № 5, которые экспрессировали  $CD11b$ , как у доноров, так и у пациенток с РМЖ в области  $SSC^{high}$  было больше, чем в  $SSC^{low}$ . В то же время количество ЦК с таким же фенотипом, но без экспрессии  $CD11b$  (№ 1) не различалось в областях  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$ . При оценке частоты встречаемости оказалось, что каждый из восьми фенотипов ЦК с равной вероятностью находился в областях  $SSC^{low}$  и  $SSC^{high}$ . Это свидетельствует о том, что клетки с экспрессией одинаковых цитокератинов и/или  $CD11b$  имеют разную степень сложности внутриклеточной организации. Судя по результатам исследования разных по функциональной активности лимфоцитов [9], можно отметить, что клетки с высокой активностью располагаются в области  $SSC^{high}$ . По-видимому, такой вывод уместен

и относительно изучаемых ЦК. ЦК с одинаковыми фенотипами, но с разными биофизическими свойствами, а значит и функциональными характеристиками, могут в разной степени быть ассоциированными с механизмами метастазирования.

При обсуждении эпителиальных признаков ЦК следует уточнить некоторые методические особенности исследования. В работе использовали анти- $EpCAM$  моноклональные антитела с двумя разными флуоресцентными метками, что позволило выявить отдельно мембранную и внутриклеточную экспрессию  $EpCAM$ . Для этого антитела с первой меткой добавляли на этапе поверхностного окрашивания, а со второй — после проведения пермеабилзации. Оба используемых коммерческих антитела против  $EpCAM$  продуцируются клонами клеток ЕВА-1 и 9С4 и обладают специфичностью, позволяющей выявлять наличие маркера как на мембране, так и внутриклеточно, в зависимости от наличия этапа пермеабилзации [12]. Казалось бы, невозможно утверждать, что окрашивание после пермеабилзации выявляет только внутриклеточную экспрессию  $EpCAM$ ,



**Рис. 3.** Общая частота встречаемости и количество клеток CD11b<sup>-</sup> и CD11b<sup>+</sup>, экспрессирующих любой из маркеров эпителиальности (основной фенотип: CD45<sup>-</sup>mEpcAM-CK7/8-CD24<sup>+</sup>Ncadh<sup>-</sup>, маркеры эпителиальности: Ecadh, panCK, icEpcAM) в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup>. **А.** Сравнение общей частоты встречаемости эпителиальных маркеров ЦК у доноров и пациенток с ИПКНТ в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup>. **Б.** Сравнение общего количества эпителиальных маркеров ЦК у доноров и пациенток с ИПКНТ в областях SSC<sup>low</sup> и SSC<sup>high</sup>.

так как существует вероятность наличия свободных антигенных эпитопов на поверхности, несмотря на избыточное добавление антител на этапе поверхностного окрашивания. Однако в нашем наблюдении ни в одном из случаев не было выявлено ни одной клетки с одновременной экспрессией EpcAM на мембране и внутри клеток (в цитоплазме или в ядре), что позволяет говорить о наличии истинной «внутриклеточной» экспрессии EpcAM.

Потеря мембранной экспрессии EpcAM может происходить в процессе ЭМП вследствие транслокации молекулы [13, 14] или обусловлена RIP (regulated intramembrane proteolysis) и эндоцитозом мембранного EpcAM с конечной деградацией в протеосомах [15, 16]. Экспрессия использованных эпителиальных маркеров (E-cadherin и pan-Cytokeratin) при отсутствии mEpcAM и наличии icEpcAM позволяет предположить, что по крайней мере часть рассматриваемых ЦК является опухолевыми клетками в состоянии выраженного ЭМП. Эти клетки можно считать ЦОК. Однако, согласно современным данным, имеется и неопухоловое происхождение обсуждаемых ЦК. Описаны эпителиальные клетки-предшественники костномозгового происхождения [17, 18]. Имеются данные о том, что клетки из костного мозга могут экспрессировать белки эпителиальных клеток и становиться эпителиальными клетками многих органов. Такие клетки негативны по лейкоцитарному маркеру CD45, но обладают экспрессией цитокератинов и выявляются только после предварительного повреждения эпителия. Это рассматривают как аргумент в пользу того, что костномозговые клетки — предшественники эпителия предназначены для регенерации [19–21]. Приведенные результаты позволяют предположить, что исследуемые ЦК, экспрессирующие эпителиальные маркеры, но без экспрессии CD45, могут быть нормальными клетками, источником которых является костный мозг. Отсутствие этих клеток у доноров не препятствует такому предположению, поскольку их количество, вероятно, может достигать цифр, достаточных для обнаружения только в условиях рекрутирования в участки регенерации или микроокружение карцином, которые, как известно, рассматривают как «незаживающую рану» [22, 23].

Два фенотипа ЦК № 1 и № 5 лишены маркеров эпителиальности. ЦК № 1 экспрессировали только CD24, а № 5 — CD24 и CD11b<sup>+</sup>. ЦК с фенотипами № 1

и № 5 не только встречались чаще в сравнении с другими обнаруженными в крови фенотипами, но и были самыми многочисленными. Касаясь происхождения этих клеток можно предположить, что это эпителиальные клетки, но с утраченными, при достижении терминальной стадии ЭМП, эпителиальными признаками, либо эти ЦК имеют неэпителиальное происхождение и принадлежат к иной неизвестной популяции.

Фенотипы ЦК № 1–4 были тождественны фенотипам № 5–8 по восьми из девяти исследуемым маркерам. Отличались эти группы фенотипов только экспрессией CD11b<sup>+</sup> в ЦК № 5–8. Как известно, интегрин CD11b экспрессируется преимущественно на моноцитах/макрофагах и нейтрофилах и некоторых субпопуляций дендритных клеток. CD11b представляет собой субъединицу интегрин альфа-M ( $\alpha$ M CD11bCD18), которая входит в состав гетеродимера  $\alpha$ M $\beta$ 2. Данный интегрин служит рецептором для фибриногена и для молекулы адгезии эндотелия ICAM-1 [24]. CD11b опосредует клеточную адгезию, хемотаксис, миграцию, фагоцитарную активность, а также ингибирует воспалительные реакции, которые инициированы через Toll-подобные рецепторы [25]. Одной из важнейших функций миелоидных клеток, экспрессирующих CD11b, является иммуносупрессия [26]. Каким может быть происхождение обнаруженных CD11b<sup>+</sup>-ЦК? Экспрессия CD11b наблюдается на достаточно поздней промоноцитарной стадии дифференцировки, в то время как CD45 должен экспрессироваться намного раньше: на стадии монобласта [27]. В связи с этим сомнительно, что рассматриваемые CD45<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>-ЦК могут относиться к миелоидным элементам (тем более клетки, экспрессирующие эпителиальные маркеры). Уместно рассматривать ЦК, коэкспрессирующие CD11b<sup>+</sup> и эпителиальные маркеры, как гибридные, возникающие вследствие гибридизации с миелоидными клетками. В таком случае ожидаема экспрессия лейкоцитарных маркеров. Не исключен и редко изучаемый, и обсуждаемый механизм ЭМП, при котором появляются не фибробластические, а лейкоцитарные признаки. Такой вариант ЭМП обоснован в одной из работ [28]. Наконец, если принять гипотезу костномозгового происхождения ЦК с эпителиальными признаками, то наличие миелоидного маркера могло быть результатом нелинейного процесса дифференцировки стволовых костномозговых клеток с

наличием в дифференцировочном континууме клеток с нетипичными фенотипами.

Необходимо уточнить, что проведенное исследование имеет ряд ограничений.

Проспективный характер исследования не позволил выяснить, действительно ли фенотипические особенности сочетания характера бокового светорассеяния с экспрессией CD11b<sup>+</sup> и наличием признаков эпителиальности сопряжены с развитием гематогенных метастазов и безметастатической выживаемостью. Более длительное наблюдение позволит ответить на эти вопросы.

Малая выборка доноров ( $n = 11$ ) могла ограничить выявление редких фенотипов ЦК в контрольной группе. Увеличение контрольной группы позволит уточнить наличие ЦК с экспрессией эпителиальных маркеров у доноров.

Неоднородность исследуемой группы пациенток с ИПКНТ также является ограничением исследования. Возможно, анализ изучаемых параметров в более однородных по молекулярно-биологическому подтипу группах пациентов позволит выявить ассоциации ЦК с эпителиальными признаками с более неблагоприятными подтипами РМЖ.

## ВЫВОДЫ

Исследуемые ЦК являются гетерогенной популяцией. Все фенотипы клеток встречались в области как SSC<sup>low</sup>, так и SSC<sup>high</sup>. ЦК с экспрессией CD11b в большем количестве встречались в области SSC<sup>high</sup> ( $p = 0,0020$  — для доноров;  $p < 0,0001$  — для пациенток с ИПКНТ). У пациенток с РМЖ из восьми обнаруженных фенотипов CD45<sup>+</sup>mEpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup> ЦК с разными вариантами коэкспрессии эпителиальных маркеров (E-cadherin, pan-Cytokeratin, и icEpCAM) и CD11b, шесть фенотипов имели признаки эпителиальности только по одному из маркеров. Все фенотипы ЦК были представлены двумя вариантами в зависимости от экспрессии CD11b. Самыми часто встречающимися и многочисленными были клетки с двумя фенотипами: CD45<sup>+</sup>mEpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>+</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> и CD45<sup>+</sup>mEpCAM<sup>+</sup>CK7/8<sup>-</sup>CD24<sup>+</sup>N-cadherin<sup>-</sup>panCK<sup>-</sup>icEpCAM<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>. У доноров выявлялись только эти два фенотипа ЦК без эпителиальных признаков. Значение бокового светорассеяния ЦК с одинаковыми фенотипами является дополнительной характеристикой. В будущих исследованиях предстоит выяснить роль этого признака в ассоциации изучаемых ЦК с развитием отдаленных метастазов.

## Литература

- Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic BC: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007; 13 (3): 920–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1695. PMID: 17289886.
- Vidlarova M, Rehulkova A, Stejskal P, Prokopova A, Slavik H, Hajdich M, et al. Recent Advances in Methods for Circulating Tumor Cell Detection. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (4): 3902. DOI: 10.3390/ijms24043902. PMID: 36835311.
- Fabisiewicz A, Szostakowska-Rodzios M, Zaczek AJ, Grzybowska EA. Circulating Tumor Cells in Early and Advanced Breast Cancer; Biology and Prognostic Value. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (5): 1671. DOI: 10.3390/ijms21051671. PMID: 32121386.
- Tashireva LA, Savelieva OE, Grigoryeva ES, Nikitin YV, Denisov EV, et al. Heterogeneous Manifestations of Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (5): 2504. DOI: 10.3390/ijms22052504. PMID: 33801519.
- Savelieva OE, Tashireva LA, Kaigorodova EV, Buzenkova AV, Mukhamedzhanov RKH, Grigoryeva ES, et al. Heterogeneity of Stemlike Circulating Tumor Cells in Invasive Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (8): 2780. DOI: 10.3390/ijms21082780. PMID: 32316333.
- Xu W, Yuan F. Detection of Circulating Tumor Cells in the Prognostic Significance of Patients with Breast Cancer: A Retrospective Study. *J Clin Lab Anal.* 2025; 39 (1): e25126. DOI: 10.1002/jcla.25126. PMID: 39692703.
- Perelmuter VM, Grigoryeva ES, Savelieva OE, Alifanov VV, Andruhova ES, Zavyalova MV, et al. EpCAM-CD24<sup>+</sup> circulating cells associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 12245. DOI: 10.1038/s41598-024-61516-2. EDN: XZHVTO.
- Chabot-Richards DS, George TI. White blood cell counts. *Clin Lab Med.* 2015; 35 (1): 11–24. DOI: 10.1016/j.cll.2014.10.007. PMID: 25676369.
- Wu T, Tan JHL, Sin WX, Luah YH, Tan SY, Goh M, et al. Cell granularity reflects immune cell function and enables selection of lymphocytes with superior attributes for immunotherapy. *Adv Sci.* 2023; 10 (28): e2302175. DOI: 10.1002/adv.202302175. PMID: 37544893.
- Watson D, Hagen N, Diver J, Marchand P, Chachisvilis M. Elastic light scattering from single cells: orientational dynamics in optical trap. *Biophys J.* 2004; 87 (2): 1298–306. DOI: 10.1529/biophysj.104.042135. PMID: 15298932.
- Grigoryeva ES, Tashireva LA, Alifanov VV, Savelieva OE, Vtorushin SV, Zavyalova MV, et al. Molecular subtype conversion in CTCs as indicator of treatment adequacy associated with metastasis-free survival in breast cancer. *Sci Rep.* 2022; 12 (1): 20949. DOI: 10.1038/s41598-022-25609-0. PMID: 36470982.
- Sterzynska K, Kempisty B, Zawierucha P, Zabel M. Analysis of the specificity and selectivity of anti-EpCAM antibodies in breast cancer cell lines. *Folia Histochem Cytobiol.* 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.5603/17845. PMID: 23264216.
- Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumor cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC cancer.* 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.1186/1471-2407-12-178. PMID: 22591372.
- Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011; 50 (5): 700–10. DOI: 10.3109/0284186X.2010.549151. PMID: 21261508.
- Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, et al. Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene.* 2014; 33 (41): 4904–15. DOI: 10.1038/onc.2013.441. PMID: 24141784.
- Перельмутер В. М., Манских В. Н. Прениша как отсутствующее звено концепции метастатических ниш, объясняющее избирательное метастазирование злокачественных опухолей и форму метастатической болезни. *Биохимия.* 2012; 77 (1): 130–9.
- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol.* 2007; 137 (6): 491–502. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06610.x. PMID: 17539772.
- Huang Y, Chanou A, Kranz G, Pan M, Kohlbauer V, Ettinger A, et al. Membrane-associated epithelial cell adhesion molecule is slowly cleaved by  $\gamma$ -secretase prior to efficient proteasomal degradation of its intracellular domain. *JBC.* 2019; 294 (9): 3051–64. DOI: 10.1074/jbc.RA118.005874. PMID: 30598504.
- Schreier S & Triampo W. The blood circulating rare cell population. What is it and what is it good for? *Cells.* 2020; 9 (4): 790. DOI: 10.3390/cells9040790. PMID: 32218149.
- Holtorf S, Boyle J, Morris R. Evidence for EpCAM and cytokeratin expressing epithelial cells in normal human and murine blood and bone marrow. *JoVE.* 2023; (194): 10.3791/65118. DOI:

- 10.3791/65118. PMID: PMC10653199.
21. Kassmer SH & Krause DS. Detection of bone marrow-derived lung epithelial cells. *Exp Hematol*. 2010; 38 (7): 564–73. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.04.011. PMID: 20447442.
  22. Van Annam JS, Herzog E, Grove J, Bruscia E, Ziegler E, Swenson S. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Stem Cell Rev*. 2005; 1 (1): 21–7. DOI: 10.1385/SCR:1:1:021. PMID: 17132871.
  23. Borue X, Lee S, Grove J, Herzog EL, Harris R, Diflo T, et al. Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol*. 2004; 165 (5): 1767–72. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63431-1. PMID: 15509544.
  24. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *JBC*. 2005; 280 (2): 1336–45. DOI: 10.1074/jbc.M406968200. PMID: 15485828.
  25. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol*. 2010; 11 (8): 734–42. DOI: 10.1038/ni.1908. PMID: 20639876.
  26. Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 5379. DOI: 10.1038/s41467-018-07387-4. PMID: 30568188.
  27. Lambert C, Preijers FW, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017; 92 (3): 180–8. DOI: 10.1002/cyto.b.21280. PMID: 26332381.
  28. Johansson J, Tabor V, Wikell A, Jalkanen S, Fuxe J. TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. *Front Oncol*. 2015; 5: 3. DOI: 10.3389/fonc.2015.00003. PMID: 25674539.

## References

1. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic BC: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res*. 2007; 13 (3): 920–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1695. PMID: 17289886.
2. Vidlarova M, Rehulkova A, Stejskal P, Prokopova A, Slavik H, Hajduch M, et al. Recent Advances in Methods for Circulating Tumor Cell Detection. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (4): 3902. DOI: 10.3390/ijms24043902. PMID: 36835311.
3. Fabisiowicz A, Szostakowska-Rodzios M, Zaczek AJ, Grzybowska EA. Circulating Tumor Cells in Early and Advanced Breast Cancer; Biology and Prognostic Value. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (5): 1671. DOI: 10.3390/ijms21051671. PMID: 32121386.
4. Tashireva LA, Savelieva OE, Grigoryeva ES, Nikitin YV, Denisov EV, et al. Heterogeneous Manifestations of Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (5): 2504. DOI: 10.3390/ijms22052504. PMID: 33801519.
5. Savelieva OE, Tashireva LA, Kaigorodova EV, Buzenkova AV, Mukhamedzhanov RK, Grigoryeva ES, et al. Heterogeneity of Stemlike Circulating Tumor Cells in Invasive Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (8): 2780. DOI: 10.3390/ijms21082780. PMID: 32316333.
6. Xu W, Yuan F. Detection of Circulating Tumor Cells in the Prognostic Significance of Patients with Breast Cancer: A Retrospective Study. *J Clin Lab Anal*. 2025; 39 (1): e25126. DOI: 10.1002/jcla.25126. PMID: 39692703.
7. Perelmuter VM, Grigoryeva ES, Savelieva OE, Alifanov VV, Andruhova ES, Zavyalova MV, et al. EpCAM-CD24+ circulating cells associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Sci Rep*. 2024; 14 (1): 12245. DOI: 10.1038/s41598-024-61516-2. EDN: XZHVTO.
8. Chabot-Richards DS, George TI. White blood cell counts. *Clin Lab Med*. 2015; 35 (1): 11–24. DOI: 10.1016/j.cl.2014.10.007. PMID: 25676369.
9. Wu T, Tan JHL, Sin WX, Luah YH, Tan SY, Goh M, et al. Cell granularity reflects immune cell function and enables selection of lymphocytes with superior attributes for immunotherapy. *Adv Sci*. 2023; 10 (28): e2302175. DOI: 10.1002/advs.202302175. PMID: 37544893.
10. Watson D, Hagen N, Diver J, Marchand P, Chachisvilis M. Elastic light scattering from single cells: orientational dynamics in optical trap. *Biophys J*. 2004; 87 (2): 1298–306. DOI: 10.1529/biophysj.104.042135. PMID: 15298932.
11. Grigoryeva ES, Tashireva LA, Alifanov VV, Savelieva OE, Vtorushin SV, Zavyalova MV, et al. Molecular subtype conversion in CTCs as indicator of treatment adequacy associated with metastasis-free survival in breast cancer. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 20949. DOI: 10.1038/s41598-022-25609-0. PMID: 36470982.
12. Sterzynska K, Kempisty B, Zawierucha P, Zabel M. Analysis of the specificity and selectivity of anti-EpCAM antibodies in breast cancer cell lines. *Folia Histochem Cytobiol*. 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.5603/17845. PMID: 23264216.
13. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, et al. Circulating tumor cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC cancer*. 2012; 50 (4): 534–41. DOI: 10.1186/1471-2407-12-178. PMID: 22591372.
14. Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol*. 2011; 50 (5): 700–10. DOI: 10.3109/0284186X.2010.549151. PMID: 21261508.
15. Driemel C, Kremling H, Schumacher S, Will D, Wolters J, Lindenlauf N, et al. Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*. 2014; 33 (41): 4904–15. DOI: 10.1038/ncr.2013.441. PMID: 24141784.
16. Perelmuter VM, Mansikh VN. Prenisha as the missing link of the metastatic niche concept explaining selective metastasis of malignant tumors and the pattern of metastatic disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 77 (1): 111–8. DOI: 10.1134/S0006297912010142. PMID: 22339641.
17. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*. 2007; 137 (6): 491–502. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06610.x. PMID: 17539772.
18. Huang Y, Chanou A, Kranz G, Pan M, Kohlbauer V, Ettinger A, et al. Membrane-associated epithelial cell adhesion molecule is slowly cleaved by  $\gamma$ -secretase prior to efficient proteasomal degradation of its intracellular domain. *JBC*. 2019; 294 (9): 3051–64. DOI: 10.1074/jbc.RA118.005874. PMID: 30598504.
19. Schreier S & Triampo W. The blood circulating rare cell population. What is it and what is it good for? *Cells*. 2020; 9 (4): 790. DOI: 10.3390/cells9040790. PMID: 32218149.
20. Holtorf S, Boyle J, Morris R. Evidence for EpCAM and cytokeratin expressing epithelial cells in normal human and murine blood and bone marrow. *JoVE*. 2023; (194): 10.3791/65118. DOI: 10.3791/65118. PMID: PMC10653199.
21. Kassmer SH & Krause DS. Detection of bone marrow-derived lung epithelial cells. *Exp Hematol*. 2010; 38 (7): 564–73. DOI: 10.1016/j.exphem.2010.04.011. PMID: 20447442.
22. Van Annam JS, Herzog E, Grove J, Bruscia E, Ziegler E, Swenson S. Engraftment of bone marrow-derived epithelial cells. *Stem Cell Rev*. 2005; 1 (1): 21–7. DOI: 10.1385/SCR:1:1:021. PMID: 17132871.
23. Borue X, Lee S, Grove J, Herzog EL, Harris R, Diflo T, et al. Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing. *Am J Pathol*. 2004; 165 (5): 1767–72. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63431-1. PMID: 15509544.
24. Solovjov DA, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *JBC*. 2005; 280 (2): 1336–45. DOI: 10.1074/jbc.M406968200. PMID: 15485828.
25. Han C, Jin J, Xu S, Liu H, Li N, Cao X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat Immunol*. 2010; 11 (8): 734–42. DOI: 10.1038/ni.1908. PMID: 20639876.
26. Schmid MC, Khan SQ, Kaneda MM, Pathria P, Shepard R, Louis TL, et al. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate

- immunity. *Nat Commun.* 2018; 9 (1): 5379. DOI: 10.1038/s41467-018-07387-4. PMID: 30568188.
27. Lambert C, Preijers FW, Yanikkaya Demirel G, Sack U. Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017; 92 (3): 180–8. DOI: 10.1002/cyto.b.21280. PMID: 26332381.
28. Johansson J, Tabor V, Wikell A, Jalkanen S, Fuxe J. TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. *Front Oncol.* 2015; 5: 3. DOI: 10.3389/fonc.2015.00003. PMID: 25674539.

## СОВРЕМЕННЫЕ МОДЕЛИ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ОПУХОЛЕЙ У ГРЫЗУНОВ: ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ В ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЕ

А. А. Фадеева<sup>1</sup>, З. М. Осипова<sup>1,2</sup>, Т. В. Чепурных<sup>1</sup>, Н. М. Мышкина<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Моделирование опухолевых процессов в грызунах активно применяют в доклинической практике для изучения динамики развития опухолей и тестирования противораковых препаратов, что дает исследователям гибкость в выборе как базовых, так и сложных персонализированных моделей опухолеобразования. Рассмотрены разнообразные современные методы визуализации модельных опухолей, включая флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг, которые позволяют проводить всесторонние исследования, начиная с качественной оценки и заканчивая *in vivo*-мониторингом. По мнению авторов, разработка автономных биолюминесцентных систем в клетках млекопитающих создаст новые возможности для неинвазивной визуализации физиологических процессов у животных, включая продолжительный мониторинг прогрессии опухолей.

**Ключевые слова:** биолюминесценция, биоимиджинг, биомедицинские исследования, автономная биолюминесценция, опухолевые модели

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-74-10105 (<https://rscf.ru/project/24-74-10105/>).

**Вклад авторов:** А. А. Фадеева — анализ литературы, написание статьи; Н. М. Мышкина — идея публикации, анализ литературы, написание статьи, руководство проектом; Т. В. Чепурных — написание и редактирование статьи; З. М. Осипова — обработка данных, редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Надежда Михайловна Мышкина  
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997, Россия; [markina.nadya@gmail.com](mailto:markina.nadya@gmail.com)

**Статья получена:** 04.03.2025 **Статья принята к печати:** 18.03.2025 **Опубликована онлайн:** 27.03.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.015

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## MODERN TUMOR IMAGING MODELS FOR RODENTS: POTENTIAL AND PROSPECTS IN TRANSLATIONAL MEDICINE

Fadeeva AA<sup>1</sup>, Osipova ZM<sup>1,2</sup>, Chepurnykh TV<sup>1</sup>, Myshkina NM<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Rodent neoplastic process models are extensively used in pre-clinical practice to assess the dynamics of tumor development and test anti-cancer drugs, which ensures flexibility of choosing both basic and advanced personalized tumor development models for researchers. Various modern model tumor imaging methods are considered, including fluorescence and bioluminescence imaging, which enable comprehensive assessment, from qualitative evaluation to *in vivo* monitoring. We believe that the development of autonomous bioluminescent systems in mammalian cells will provide new possibilities for noninvasive imaging of animal physiological processes, including long-term monitoring of tumor progression.

**Keywords:** bioluminescence, bioimaging, biomedical research, autonomous bioluminescence, tumor models

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation grant, project No. 24-74-10105 (<https://rscf.ru/project/24-74-10105/>).

**Author contribution:** Fadeeva AA — literature review, manuscript writing; Myshkina NM — paper concept, literature review, manuscript writing, project management; Chepurnykh TV — manuscript writing and editing; Osipova ZM — data processing, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nadezhda M. Myshkina  
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; [markina.nadya@gmail.com](mailto:markina.nadya@gmail.com)

**Received:** 04.03.2025 **Accepted:** 18.03.2025 **Published online:** 27.03.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.015

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Онкологические заболевания представляют собой одну из самых разнообразных категорий, как с точки зрения формирования опухолей, так и с точки зрения их лечения. Несмотря на это, выделение общих признаков и даже моделирование течения заболевания в других видах животных (например, в грызунах) возможно для многих видов новообразований. При очевидных различиях в анатомии и структуре генома между человеком и грызунами эти модели оптимальны для проведения доклинических исследований [1]. Моделирование опухолевых процессов постоянно развивается и значительно изменилось за более чем полвека с момента описания первых моделей. Как и в других отраслях биомедицинской науки, исследователи отдают предпочтение способам, позволяющим получить более точную информацию

на меньшем числе экспериментальных объектов и с меньшими финансовыми затратами. Таким образом, фокус внимания смещается в сторону прижизненных и неинвазивных методов исследования модельных опухолей с помощью простой аппаратуры. В частности, методы флуоресцентного и биолюминесцентного имиджинга делают возможным продолжительный и высокочувствительный мониторинг развития и лечения опухолей грызунов. Примером опухоли, пригодной для подобного мониторинга, может служить созданная под руководством Владимира Баклаушева высокоинвазивная флуоресцентная/биолюминесцентная ортотопическая модель глиобластомы у мышей, полученная от пациента [2]. Исследователям удалось впервые неинвазивно зарегистрировать формирование опухоли менее чем

через неделю после инокуляции, а затем отслеживать ее рост сразу двумя ортогональными способами имиджинга (биолюминесцентным и флуоресцентным).

Цель данной работы — рассмотреть современные модели опухолей в грызунах, а также методы их визуализации, и предположить, какие из методов будут развиваться наиболее активно в ближайшее время, предоставляя исследователям наиболее широкие возможности.

Богатый выбор модельных животных и типичных опухолевых моделей позволяет подобрать оптимальный подход под каждое конкретное исследование. Основные модельные виды грызунов включают в себя мышей (*Mus musculus*) [3], крыс (*Rattus norvegicus*) [4], морских свинок (*Cavia porcellus*) и сирийских золотых хомячков (*Mesocricetus auratus*) [5] (рис. 1А). Список, однако, не исчерпывается этими видами: применяют также сурков, полевок, белок, дегу и других грызунов [6]. К методам создания модельных опухолей относятся сингенные модели, модели ксенотрансплантации, модели опухоли *in situ*, генно-модифицированные мышечные модели, модели ксенотрансплантата пациента (patient-derived xenograft, PDX) и модель канцероген-индуцированного рака [4] (рис. 1Б).

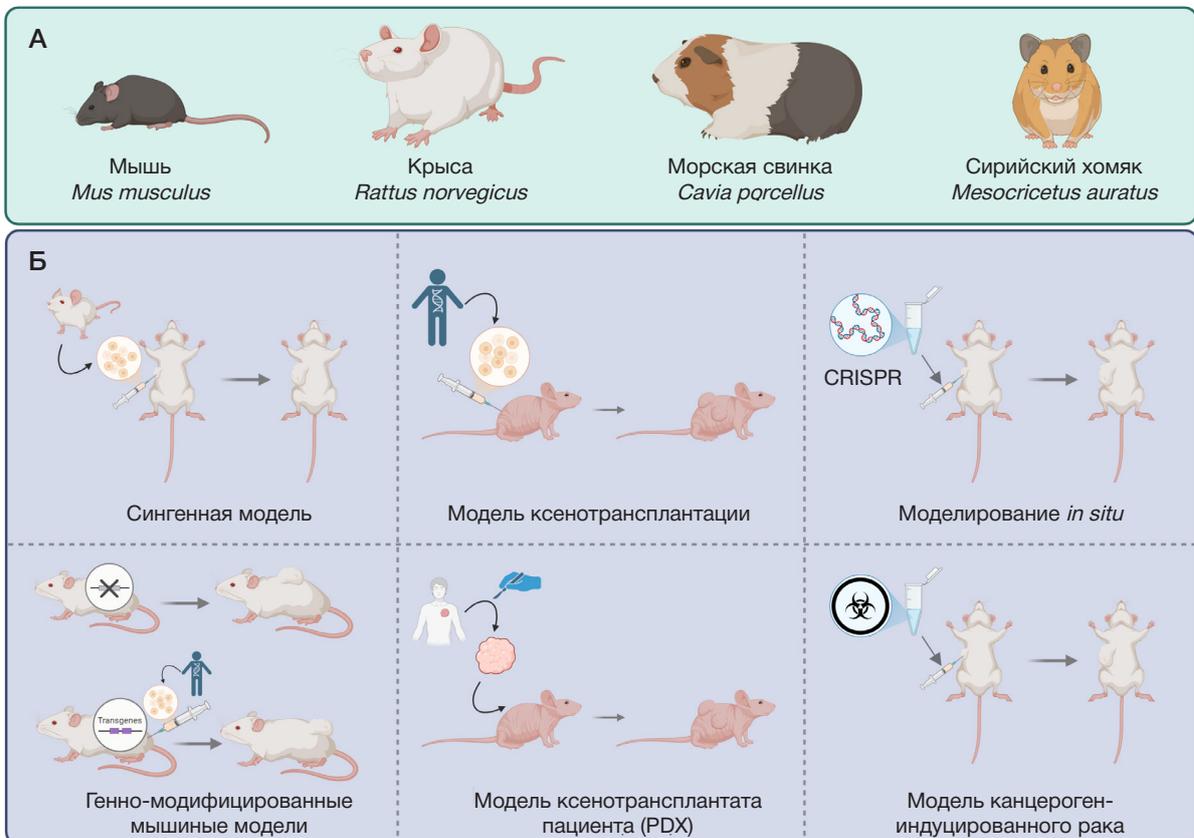
Сингенные модели и модели ксенотрансплантации известны с 1960-х гг. — это опухоли, развивающиеся из введенных в модельный организм трансформированных клеток, которые были культивированы *in vitro*; в зависимости от типа модели вид организма либо совпадает (сингенные модели), либо отличается (модели ксенотрансплантации) — во втором случае используют иммунодефицитных модельных животных. Несмотря на то что данные модели не способны достоверно воспроизвести микроокружение опухоли, они подходят для первичного тестирования противоопухолевых препаратов. Кроме того, сингенные модели опухоли мыши

могут быть использованы для оценки эффективности CAR-T-терапии солидных опухолей [7].

Модель ксенотрансплантата пациента в значительной степени аналогична описанным, однако модельному иммунодефицитному животному вводят полученные напрямую от пациента фрагменты биопсии опухоли для экспериментального подбора персонализированной терапии. Такой подход позволяет идентифицировать биомаркеры ответа и терапевтические мишени для различных по молекулярному профилю подгрупп опухолей [8].

Моделирование *in situ* позволяет добиться развития опухоли конкретного органа с помощью локального редактирования генов и во многом пересекается с канцероген-индуцированными моделями, которые также могут быть локальными. Оба этих подхода применяют для развития собственной опухоли животного, что позволяет лучше воссоздать, например, кровоснабжение, однако они ограниченно применимы для имитации канцерогенеза человека. Примером канцероген-индуцированной мышечной модели служит колит-ассоциированная модель колоректального рака, полученная внутрибрюшинной обработкой азоксиметаном мышей линии CD4-dnTGFβRII [9].

Наконец, в генно-модифицированных мышечных моделях используют все варианты мышей с устойчиво измененным генотипом: в некоторых случаях вследствие нокаута регуляторных генов они более подвержены спонтанному канцерогенезу определенных органов, в других — имитируют иммунную систему человека (гуманизированные мыши) и оптимально подходят для введения опухолевых клеток человека. К недостаткам генно-модифицированных мышечных моделей можно отнести долгий цикл их производства и высокую стоимость. В качестве примера генно-модифицированных мышечных моделей можно



**Рис. 1.** Основные модели, используемые для тестирования противоопухолевых препаратов. **А.** Виды животных, на долю которых приходится большинство экспериментальных моделей. **Б.** Наиболее распространенные способы моделирования опухолей животных (на примере мышей)

привести линию мышей, избыточно экспрессирующую ген рецептора лютеинизирующего гормона, которая склонна к спонтанному развитию рака эндометрия [10].

Визуализация опухолевых процессов в моделях на животных прошла путь от стандартной оценки расположения и размера опухоли до сложного мультимодального анализа молекулярных, физиологических, генетических, иммунологических и биохимических событий на микроскопическом и макроскопическом уровнях, выполняемого неинвазивно и иногда в режиме реального времени [11]. В отличие от некропсии, неинвазивные методы визуализации позволяют оценить опухолевое поражение организма без необходимости жертвовать опытным животным. Благодаря неинвазивности становятся доступными длительные наблюдения с получением более точных результатов и одновременным сокращением числа необходимых особей [12]. Для визуализации опухолей в небольших животных в последнее время стали доступны такие имиджинговые технологии, как магнитная резонансная томография (МРТ), микрокомпьютерная томография (микроКТ), биолюминесцентный и флуоресцентный имиджинг, позитрон-эмиссионная томография (ПЭТ) и др. Мультимодальный имиджинг позволяет отслеживать структурные и физиологические изменения, метаболические процессы, трансплантируемые клетки и целевые молекулы, а также проводить визуализацию опухоли в отдельных органах и во всем теле животного. Использование наночастиц является мощным дополняющим инструментом к указанным методам, благодаря высокому разрешению, селективности и универсальности [13, 14].

Среди всех методов визуализации МРТ является одним из самых информативных, благодаря высокому разрешению и отличной контрастности, которая может быть усилена добавлением экзогенных парамагнитных контрастных веществ. Данный метод позволяет выявлять сверхмалые опухоли (диаметром до 0,2 мм) в хорошо структурированных тканях и является «золотым стандартом» для ортотопических опухолей мозга, а также широко применяется для детектирования метастазов в других мягких тканях, включая печень и легкие [15]. Показано, что масса колоректальной карциномы, рассчитанная по данным МРТ *in vivo*, достаточно точно коррелирует с массой карциномы, измеренной *ex vivo*, в то время как интенсивность биолюминесцентного сигнала коррелирует относительно слабо, и эта разница в корреляциях весьма значительна. Однако недостатком МРТ определенно являются его высокая стоимость и ограничение в наблюдении за опухолевым процессом на ранних стадиях после имплантации [16].

По сравнению с МРТ, КТ значительно уступает в качестве распознавания мягких тканей и органов, однако главные преимущества микроКТ в его высокой разрешающей способности (<50 мкм) и быстрой визуализации легких и костной ткани, позволяющих выявить онкологические новообразования. Поскольку кости являются распространенным метастатическим очагом основных видов злокачественных новообразований (включая карциномы молочной железы и простаты), в нескольких исследованиях сообщалось об использовании микроКТ высокого разрешения (10 мкм) для обнаружения метастазов карцином молочной железы разной этиологии в костной ткани [17]. Помимо этого, микроКТ особенно хорошо подходит для получения высококачественной анатомической информации о легких [18]. Таким образом, использование трехмерного анализа позволяет получить

точные данные о числе, размерах и прогрессии опухолей и имеет преимущество по сравнению с традиционной гистологией или резекцией легкого. Однако для регистрации опухолей мягких тканей необходимо дополнительное введение контрастных агентов, что усложняет процедуру [19].

К широко применяемым методам относится и ядерная диагностика, при которой изображение получают путем введения короткоживущих радиоактивных изотопов и регистрации их распада с помощью гамма-камеры (SPECT) или ПЭТ-сканера, выявляя в результате пространственное и временное распределение радиоактивных веществ и лекарственных препаратов, специфичных для конкретной мишени. ПЭТ с  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозой ( $^{18}\text{F}$ FDG) — наиболее распространенный метод визуализации как в доклинических, так и в клинических исследованиях [20]. Для данного метода характерны высокие специфичность и чувствительность, а также положительная прогностическая ценность при выявлении опухолей. В то же время модельные животные требуют определенной подготовки к  $^{18}\text{F}$ FDG-ПЭТ-сканированию, в частности, строгих диетических ограничений, чтобы уровни базового метаболизма глюкозы не маскировали результаты исследования [21].

Флуоресцентный имиджинг применяют для визуализации биологических процессов во всем организме с помощью генетически закодированных флуоресцентных белков или флуоресцентных красителей [22]. Биолюминесцентный имиджинг также относится к эффективным неинвазивным методам визуализации, в его основе лежит биохимическая реакция окисления субстрата (люциферина) кислородом воздуха под действием специфического фермента (люциферазы) с испусканием света. В отличие от флуоресценции, биолюминесценция не требует внешнего источника света, и, следовательно, не обладает связанными с ним побочными эффектами, а именно автофлуоресценцией и фотообесцвечиванием [23]. Несомненные преимущества биолюминесцентного имиджинга в относительной простоте использования, скорости получения изображения, более низкой стоимости по сравнению с МРТ, а также высокой чувствительности, что делает этот метод востребованным в доклинических исследованиях. Потенциальные недостатки метода — необходимость в генетической модификации клеток и в экзогенном добавлении субстрата. Стоит отметить, что и биолюминесцентный, и флуоресцентный имиджинг показывают высокую эффективность в обнаружении небольших непальпируемых опухолей, однако оба метода страдают от снижения сигнала из-за поглощения и рассеяния тканей, что ограничивает глубину, на которой можно визуализировать опухоли, и затрудняет получение количественных данных из более глубоких тканей [24].

Принципиальные недостатки биолюминесцентного имиджинга модельных опухолей *in vivo* можно преодолеть путем перехода к автономным биолюминесцентным системам. Такие системы не требуют экзогенного добавления субстрата, что одновременно снижает стоимость их использования и упрощает проведение измерений. Принципиально подтверждена возможность создания полностью автономно биолюминесцентной мыши [25], а опухоли таких мышей подходят для создания, как минимум, сингенных моделей. Также существует возможность генной модификации только опухоли для автономной биолюминесценции. В таком случае для доставки генов автономных биолюминесцентных систем можно использовать вирусы, прицельно поражающие

раковые клетки: в зависимости от типа рака к таким могут относиться аденовирусы, поксвирусы, вирус простого герпеса 1-го типа (HSV-1), вирусы Коксаки, полиовирус, вирус кори, вирус болезни Ньюкасла (NDV), реовирусы и др. [26]. Альтернативным методом может быть доставка соответствующих мРНК с помощью липидных наночастиц [14]. Повысить чувствительность метода может обработка кожи грызуна специальными красителями с высоким поглощением в фиолетовой и синей областях спектра, которые прижизненно и обратимо делают кожные покровы прозрачными в видимой области спектра [27, 28].

В настоящее время ключевым недостатком является невысокая яркость автономных биолюминесцентных систем, однако научные группы в разных странах ведут работы по их улучшению, в частности, благодаря использованию природных ортологов необходимых ферментов или их модификаций, полученных с помощью направленного мутагенеза [29]. Мы считаем, что в будущем автономно биолюминесцентные модели опухолей грызунов войдут в широкую доклиническую практику наравне с классическими моделями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методы создания опухолевых моделей у грызунов, рассмотренные в данном обзоре, в сочетании с инновационными подходами визуализации существенно расширили возможности доклинических исследований. В ближайшем будущем значительный потенциал развития имеют автономные биолюминесцентные модели, которые используют генетически закодированные люциферазы и ферменты биосинтеза люциферина для неинвазивного мониторинга опухолей. Такие системы позволяют проводить долгосрочный мониторинг с высоким пространственно-временным разрешением без необходимости экзогенного добавления субстрата, что особенно важно для изучения метастазирования и отслеживания изменений опухолей при обработке терапевтическими агентами. Подходы, основанные на автономной биолюминесценции, могут стать ценным инструментом трансляционной онкологии, способствуя переходу к более персонализированным доклиническим исследованиям.

## Литература

- Hollingshead MG. Antitumor efficacy testing in rodents. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100: 1500–10. DOI: 10.1093/jnci/djn351.
- Yuzhakova D, Kiseleva E, Shirmanova M, Shcheslavskiy V, Sachkova D, Snopova L, et al. Highly invasive fluorescent/bioluminescent patient-derived orthotopic model of glioblastoma in mice. *Front Oncol.* 2022; 12: 897839. DOI: 10.3389/fonc.2022.897839.
- Utz B, Turpin R, Lampe J, Pouwels J, Klefström J. Assessment of the WAP-Myc mouse mammary tumor model for spontaneous metastasis. *Sci Rep.* 2020; 10: 18733. DOI: 10.1038/s41598-020-75411-z.
- Guo H, Xu X, Zhang J, Du Y, Yang X, He Z, et al. The pivotal role of preclinical animal models in anti-cancer drug discovery and personalized cancer therapy strategies. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024; 17: 1048. DOI: 10.3390/ph17081048.
- Wang Z, Cormier RT. Golden Syrian hamster models for cancer research. *Cells.* 2022; 11: 2395. DOI: 10.3390/cells11152395.
- Jackson RK. Unusual laboratory rodent species: Research uses, care, and associated biohazards. *ILAR J.* 1997; 38: 13–21. DOI: 10.1093/ilar.38.1.13.
- Ahmed EN, Cutmore LC, Marshall JF. Syngeneic mouse models for pre-clinical evaluation of CAR T cells. *Cancers (Basel).* 2024; 16: 3186. DOI: 10.3390/cancers16183186.
- Zanella ER, Grassi E, Trusolino L. Towards precision oncology with patient-derived xenografts. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022; 19: 719–32. DOI: 10.1038/s41571-022-00682-6.
- Uragami T, Ando Y, Aoi M, Fukui T, Matsumoto Y, Horitani S, et al. Establishment of a novel colitis-associated cancer mouse model showing flat invasive neoplasia. *Dig Dis Sci.* 2023; 68: 1885–93. DOI: 10.1007/s10620-022-07774-4.
- Lottini T, Iorio J, Lastraioli E, Carraresi L, Duranti C, Sala C, et al. Transgenic mice overexpressing the LH receptor in the female reproductive system spontaneously develop endometrial tumour masses. *Sci Rep.* 2021; 11: 8847. DOI: 10.1038/s41598-021-87492-5.
- Serkova NJ, Glunde K, Haney CR, Farhoud M, De Lille A, Redente EF, et al. Preclinical applications of multi-platform imaging in animal models of cancer. *Cancer Res.* 2021; 81: 1189–200. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0373.
- Bausart M, Bozzato E, Joudiou N, Koutsoumpou X, Manshian B, Pr at V, et al. Mismatch between bioluminescence imaging (BLI) and MRI when evaluating glioblastoma growth: Lessons from a study where BLI suggested “regression” while MRI showed “progression”. *Cancers (Basel).* 2023; 15: 1919. DOI: 10.3390/cancers15061919.
- Yin C, Hu P, Qin L, Wang Z, Zhao H. The current status and future directions on nanoparticles for tumor molecular imaging. *Int J Nanomedicine.* 2024; 19: 9549–9574. DOI: 10.2147/IJN.S484206.
- Liu B, Zhou H, Tan L, Siu KTH, Guan X-Y. Exploring treatment options in cancer: Tumor treatment strategies. *Signal Transduct Target Ther.* 2024; 9: 175. DOI: 10.1038/s41392-024-01856-7.
- Green AL, DeSisto J, Flannery P, Lemma R, Knox A, Lemieux M, et al. BPTF regulates growth of adult and pediatric high-grade glioma through the MYC pathway. *Oncogene.* 2020; 39: 2305–27. DOI: 10.1038/s41388-019-1125-7.
- Ravoori MK, Margalit O, Singh S, Kim S-H, Wei W, Menter DG, et al. Magnetic resonance imaging and bioluminescence imaging for evaluating tumor burden in orthotopic colon cancer. *Sci Rep.* 2019; 9: 6100. DOI: 10.1038/s41598-019-42230-w.
- Previdi S, Abbadessa G, Dal  F, France DS, Broggini M. Breast cancer-derived bone metastasis can be effectively reduced through specific c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) and shRNA c-MET knockdown. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11: 214–23. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0277.
- Pennati F, Leo L, Ferrini E, Sverzellati N, Bernardi D, Stellari FF, et al. Micro-CT-derived ventilation biomarkers for the longitudinal assessment of pathology and response to therapy in a mouse model of lung fibrosis. *Sci Rep.* 2023; 13: 4462. DOI: 10.1038/s41598-023-30402-8.
- Tan MJ, Fernandes N, Williams KC, Ford NL. In vivo micro-computed tomography imaging in liver tumor study of mice using Fenestra VC and Fenestra HDVC. *Sci Rep.* 2022; 12: 22399. DOI: 10.1038/s41598-022-26886-5.
- Hesketh RL, Wang J, Wright AJ, Lewis DY, Denton AE, Grenfell R, et al. Magnetic resonance imaging is more sensitive than PET for detecting treatment-induced cell death-dependent changes in glycolysis. *Cancer Res.* 2019; 79: 3557–69. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0182.
- Toner YC, Pr vot G, van Leent MMT, Munitz J, Oosterwijk R, Verschuur AVD, et al. Macrophage PET imaging in mouse models of cardiovascular disease and cancer with an apolipoprotein-inspired radiotracer. *Npj Imaging.* 2024; 2: 12. DOI: 10.1038/s44303-024-00009-3.
- Ito R, Kamiya M, Urano Y. Molecular probes for fluorescence image-guided cancer surgery. *Curr Opin Chem Biol.* 2022; 67: 102112. DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.102112.
- Townsend KM, Prescher JA. Recent advances in bioluminescent probes for neurobiology. *Neurophotonics.* 2024; 11: 024204. DOI: 10.1117/1.NPh.11.2.024204.
- Gleneadie HJ, Dimond A, Fisher AG. Harnessing bioluminescence

- for drug discovery and epigenetic research. *Front Drug Discov (Lausanne)*. 2023; 3: 1249507. DOI: 10.3389/fddsv.2023.1249507.
25. Kiszka KA, Dullin C, Steffens H, Koenen T, Rothermel E, Alves F, et al. Autonomous bioluminescence emission from transgenic mice. *bioRxiv*. 2024. DOI: 10.1101/2024.06.13.598801.
  26. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15: 660. DOI: 10.1038/nrd.2016.178.
  27. Ou Z, Duh Y-S, Rommelfanger NJ, Keck CHC, Jiang S, Brinson K Jr, et al. Achieving optical transparency in live animals with absorbing molecules. *Science*. 2024; 385: eadm6869. DOI: 10.1126/science.adm6869.
  28. Keck CHC, Schmidt EL, Roth RH, Floyd BM, Tsai AP, Garcia HB, et al. Color-neutral and reversible tissue transparency enables longitudinal deep-tissue imaging in live mice. *bioRxiv.org*. 2025. p. 2025.02.20.639185. DOI: 10.1101/2025.02.20.639185.
  29. Shakhova ES, Karataeva TA, Markina NM, Mitiouchkina T, Palkina KA, Perfilov MM, et al. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes. *Nat Methods*. 2024; 21: 406–10. DOI: 10.1038/s41592-023-02152-y.

## References

1. Hollingshead MG. Antitumor efficacy testing in rodents. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100: 1500–10. DOI: 10.1093/jnci/djn351.
2. Yuzhakova D, Kiseleva E, Shirmanova M, Shcheslavskiy V, Sachkova D, Snopova L, et al. Highly invasive fluorescent/bioluminescent patient-derived orthotopic model of glioblastoma in mice. *Front Oncol*. 2022; 12: 897839. DOI: 10.3389/fonc.2022.897839.
3. Utz B, Turpin R, Lampe J, Pouwels J, Klefström J. Assessment of the WAP-Myc mouse mammary tumor model for spontaneous metastasis. *Sci Rep*. 2020; 10: 18733. DOI: 10.1038/s41598-020-75411-z.
4. Guo H, Xu X, Zhang J, Du Y, Yang X, He Z, et al. The pivotal role of preclinical animal models in anti-cancer drug discovery and personalized cancer therapy strategies. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024; 17: 1048. DOI: 10.3390/ph17081048.
5. Wang Z, Cormier RT. Golden Syrian hamster models for cancer research. *Cells*. 2022; 11: 2395. DOI: 10.3390/cells11152395.
6. Jackson RK. Unusual laboratory rodent species: Research uses, care, and associated biohazards. *ILAR J*. 1997; 38: 13–21. DOI: 10.1093/ilar.38.1.13.
7. Ahmed EN, Cutmore LC, Marshall JF. Syngeneic mouse models for pre-clinical evaluation of CAR T cells. *Cancers (Basel)*. 2024; 16: 3186. DOI: 10.3390/cancers16183186.
8. Zanella ER, Grassi E, Trusolino L. Towards precision oncology with patient-derived xenografts. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022; 19: 719–32. DOI: 10.1038/s41571-022-00682-6.
9. Uragami T, Ando Y, Aoi M, Fukui T, Matsumoto Y, Horitani S, et al. Establishment of a novel colitis-associated cancer mouse model showing flat invasive neoplasia. *Dig Dis Sci*. 2023; 68: 1885–93. DOI: 10.1007/s10620-022-07774-4.
10. Lottini T, Iorio J, Lastraioli E, Carrarsi L, Duranti C, Sala C, et al. Transgenic mice overexpressing the LH receptor in the female reproductive system spontaneously develop endometrial tumour masses. *Sci Rep*. 2021; 11: 8847. DOI: 10.1038/s41598-021-87492-5.
11. Serkova NJ, Glunde K, Haney CR, Farhoud M, De Lille A, Redente EF, et al. Preclinical applications of multi-platform imaging in animal models of cancer. *Cancer Res*. 2021; 81: 1189–200. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0373.
12. Bausart M, Bozzato E, Joudiou N, Koutsoumpou X, Manshian B, Pr at V, et al. Mismatch between bioluminescence imaging (BLI) and MRI when evaluating glioblastoma growth: Lessons from a study where BLI suggested “regression” while MRI showed “progression”. *Cancers (Basel)*. 2023; 15: 1919. DOI: 10.3390/cancers15061919.
13. Yin C, Hu P, Qin L, Wang Z, Zhao H. The current status and future directions on nanoparticles for tumor molecular imaging. *Int J Nanomedicine*. 2024; 19: 9549–9574. DOI: 10.2147/IJN.S484206.
14. Liu B, Zhou H, Tan L, Siu KTH, Guan X-Y. Exploring treatment options in cancer: Tumor treatment strategies. *Signal Transduct Target Ther*. 2024; 9: 175. DOI: 10.1038/s41392-024-01856-7.
15. Green AL, DeSisto J, Flannery P, Lemma R, Knox A, Lemieux M, et al. BPTF regulates growth of adult and pediatric high-grade glioma through the MYC pathway. *Oncogene*. 2020; 39: 2305–27. DOI: 10.1038/s41388-019-1125-7.
16. Ravoori MK, Margalit O, Singh S, Kim S-H, Wei W, Menter DG, et al. Magnetic resonance imaging and bioluminescence imaging for evaluating tumor burden in orthotopic colon cancer. *Sci Rep*. 2019; 9: 6100. DOI: 10.1038/s41598-019-42230-w.
17. Prevedi S, Abbadessa G, Dal  F, France DS, Broggin M. Breast cancer-derived bone metastasis can be effectively reduced through specific c-MET inhibitor tivantinib (ARQ 197) and shRNA c-MET knockdown. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11: 214–23. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0277.
18. Pennati F, Leo L, Ferrini E, Sverzellati N, Bernardi D, Stellari FF, et al. Micro-CT-derived ventilation biomarkers for the longitudinal assessment of pathology and response to therapy in a mouse model of lung fibrosis. *Sci Rep*. 2023; 13: 4462. DOI: 10.1038/s41598-023-30402-8.
19. Tan MJ, Fernandes N, Williams KC, Ford NL. In vivo micro-computed tomography imaging in liver tumor study of mice using Fenestra VC and Fenestra HDVC. *Sci Rep*. 2022; 12: 22399. DOI: 10.1038/s41598-022-26886-5.
20. Hesketh RL, Wang J, Wright AJ, Lewis DY, Denton AE, Grenfell R, et al. Magnetic resonance imaging is more sensitive than PET for detecting treatment-induced cell death-dependent changes in glycolysis. *Cancer Res*. 2019; 79: 3557–69. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0182.
21. Toner YC, Pr vot G, van Leent MMT, Munitz J, Oosterwijk R, Verschuur AVD, et al. Macrophage PET imaging in mouse models of cardiovascular disease and cancer with an apolipoprotein-inspired radiotracer. *Npj Imaging*. 2024; 2: 12. DOI: 10.1038/s44303-024-00009-3.
22. Ito R, Kamiya M, Urano Y. Molecular probes for fluorescence image-guided cancer surgery. *Curr Opin Chem Biol*. 2022; 67: 102112. DOI: 10.1016/j.cbpa.2021.102112.
23. Townsend KM, Prescher JA. Recent advances in bioluminescent probes for neurobiology. *Neurophotonics*. 2024; 11: 024204. DOI: 10.1117/1.NPh.11.2.024204.
24. Geneadie HJ, Dimond A, Fisher AG. Harnessing bioluminescence for drug discovery and epigenetic research. *Front Drug Discov (Lausanne)*. 2023; 3: 1249507. DOI: 10.3389/fddsv.2023.1249507.
25. Kiszka KA, Dullin C, Steffens H, Koenen T, Rothermel E, Alves F, et al. Autonomous bioluminescence emission from transgenic mice. *bioRxiv*. 2024. DOI: 10.1101/2024.06.13.598801.
26. Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15: 660. DOI: 10.1038/nrd.2016.178.
27. Ou Z, Duh Y-S, Rommelfanger NJ, Keck CHC, Jiang S, Brinson K Jr, et al. Achieving optical transparency in live animals with absorbing molecules. *Science*. 2024; 385: eadm6869. DOI: 10.1126/science.adm6869.
28. Keck CHC, Schmidt EL, Roth RH, Floyd BM, Tsai AP, Garcia HB, et al. Color-neutral and reversible tissue transparency enables longitudinal deep-tissue imaging in live mice. *bioRxiv.org*. 2025. p. 2025.02.20.639185. DOI: 10.1101/2025.02.20.639185.
29. Shakhova ES, Karataeva TA, Markina NM, Mitiouchkina T, Palkina KA, Perfilov MM, et al. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes. *Nat Methods*. 2024; 21: 406–10. DOI: 10.1038/s41592-023-02152-y.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ НОСИТЕЛЬСТВА АУТОАНТИТЕЛ У ПАЦИЕНТОВ С ЦЕЛИАКИЕЙ МЕТОДАМИ МОНО- И МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ИММУНОАНАЛИЗА

Н. Ф. Нуралиева<sup>1</sup>✉, М. Ю. Юкина<sup>1</sup>, С. В. Быкова<sup>2</sup>, Е. Н. Савватеева<sup>3</sup>, Л. В. Никанкина<sup>1</sup>, Е. В. Кулагина<sup>3</sup>, Б. Л. Шаскольский<sup>3</sup>, Д. А. Грядун<sup>3</sup>, Е. А. Трошина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Поиск сопутствующих аутоиммунных заболеваний (АИЗ) у пациентов с целиакией является актуальной задачей. Целью исследования было определить частоту носительства антител (АТ) — маркеров развития АИЗ у пациентов с целиакией с помощью различных иммунологических подходов. У пациентов с целиакией (группа 1,  $n = 27$ ) и здоровых лиц (группа 2,  $n = 16$ ) в сыворотке крови с использованием ИФА и метода мультиплексного иммуноанализа (МИ) на гидрогелевом биочипе определены АТ к тиреоидной пероксидазе (ТПО), тиреоглобулину (ТГ), глутаматдекарбоксилазе (GAD), островковым клеткам поджелудочной железы (ICA), тирозинфосфатазе (IA2), 21-гидроксилазе (P450c21), внутреннему фактору Кастла, тканевой трансглутаминазе (TGM2). Биочип также позволяет проводить исследование АТ к интерферонам (ИФН) альфа и омега, интерлейкину 22. Методом ИФА в группе 1 выявлены АТ к IA2 (30%), ТПО (22%), ТГ (19%), GAD (19%), в группе 2 — к IA2 (38%), ТПО (19%), GAD (19%). В группе 1 с использованием биочипа обнаружены АТ к ТПО (11%), ТГ (11%), P450c21 (4%), ИФН-альфа (4%), ICA (4%), в группе 2 — к ТПО (13%), ICA (13%), ТГ (6%), ИФН-альфа (6%). Значимых различий в частоте повышения АТ в группах не выявлено ( $p > 0,05$ ). У пациентов с носительством АТ, выявленных на биочипах, при отрицательном результате ИФА не исключается развитие АИЗ в отсроченном периоде, что позволяет предположить прогностическую значимость МИ. Отсутствие значимых различий в частоте повышения АТ среди пациентов с целиакией и здоровых лиц может быть обусловлено ограниченной численностью групп наблюдения и свидетельствовать о высокой распространенности потенциальных форм АИЗ в данных когортах.

**Ключевые слова:** целиакия, аутоиммунные заболевания, скрининг, мультиплексный иммуноанализ, гидрогелевый биочип

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Фонда научно-технологического развития Югры № 2023-571-05/2023.

**Вклад авторов:** Н. Ф. Нуралиева — анализ литературы, концепция и дизайн исследования, обследование пациентов, сбор материала, лабораторные исследования, анализ и интерпретация результатов, написание статьи; М. Ю. Юкина — анализ литературы, концепция и дизайн исследования, обследование пациентов, сбор материала, лабораторные исследования, анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование статьи; С. В. Быкова — обследование пациентов, сбор материала, редактирование статьи; Е. Н. Савватеева — анализ литературы, концепция и дизайн исследования, лабораторные исследования на биочипах, анализ и интерпретация результатов; Е. В. Кулагина, Л. В. Никанкина — лабораторные исследования (ИФА); Б. Л. Шаскольский — анализ результатов мультиплексного исследования аутоантител; Д. А. Грядун — концепция и дизайн исследования; редактирование статьи; Е. А. Трошина — редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Минздрава России (протокол № 14 от 29 июля 2022 г.). Все пациенты и условно здоровые лица подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Нурана Фейзуллаевна Нуралиева  
ул. Дмитрия Ульянова, д. 11, г. Москва, 117292, Россия; nnurana@yandex.ru

**Статья получена:** 02.04.2025 **Статья принята к печати:** 16.04.2025 **Опубликована онлайн:** 23.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.020

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## DETERMINATION OF THE RATE OF AUTOANTIBODY CARRIER STATE IN PATIENTS WITH CELIAC DISEASE BY MONO- AND MULTIPLEX IMMUNOASSAY

Nuralieva NF<sup>1</sup>✉, Yukina MYu<sup>1</sup>, Bykova SV<sup>2</sup>, Savvateeva EN<sup>3</sup>, Nikankina LV<sup>1</sup>, Kulagina EV<sup>3</sup>, Shaskolskiy BL<sup>3</sup>, Gryadunov DA<sup>3</sup>, Troshina EA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Loginov Moscow Clinical Scientific Centre, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The search for concomitant autoimmune disorders (ADs) in patients with celiac disease is a pressing issue. The study aimed to determine the rate of the carrier state for antibodies (Abs) being the markers of AD development in patients with celiac disease using various immunological approaches. Enzyme-linked immunoassay and hydrogel microarray-based multiplex immunoassay (MI) were used to determine Abs against thyroid peroxidase (TPO), thyroglobulin (TG), glutamate decarboxylase (GAD), pancreatic islet cells (ICA), tyrosine phosphatase (IA2), 21-hydroxylase (P450c21), Castle's intrinsic factor, tissue transglutaminase (TGM2) in blood serum of patients with celiac disease (group 1,  $n = 27$ ) and healthy individuals (group 2,  $n = 16$ ). The microarray also enables testing of Abs against interferons (IFN) alpha and omega, interleukin 22. In group 1, Abs against IA2 (30%), TPO (22%), TG (19%), GAD (19%) were detected by the enzyme-linked immunoassay, and in group 2 Abs against IA2 (38%), TPO (19%), GAD (19%) were detected. In group 1, Abs against TPO (11%), TG (11%), P450c21 (4%), IFN-alpha (4%), ICA (4%) were detected using the microarray, and in group 2 Abs against TPO (13%), ICA (13%), TG (6%), IFN-alpha (6%) were identified. No significant differences in the rate of elevated Abs in the groups were revealed ( $p > 0.05$ ). Patients, in whom the Ab carrier state was established using microarrays, with negative results enzyme-linked immunoassay can develop the delayed ADs, which suggests prognostic value of MI. The lack of significant differences in the rate of elevated Abs in patients with celiac disease and healthy individuals can result from small size of the studied groups and can suggest high prevalence of potential AD forms in these cohorts.

**Keywords:** celiac disease, autoimmune diseases, screening, multiplex immunoassay, hydrogel microarray

**Funding:** the study was supported by the Foundation for Scientific and Technological Development of Yurga (No. 2023-571-05/2023).

**Author contribution:** Nuralieva NF — literature review, study concept and design, patient assessment, material collection, laboratory testing, analysis and interpretation of the results, manuscript writing; Yukina MYu — literature review, study concept and design, patient assessment, material collection, laboratory testing, analysis and interpretation of the results, manuscript writing and editing; Bykova SV — patient assessment, material collection, manuscript editing; Savvateeva EN — literature review, study concept and design; laboratory microarray testing; analysis and interpretation of the results; Kulagina EV, Nikankina LV — laboratory testing (ELISA); Shaskolskiy BL — analysis of the autoantibody multiplex testing results; Gryadunov DA — study concept and design; manuscript editing; Troshina EA — manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Endocrinology Research Centre (protocol No. 14 dated 29 July 2022). All the patients and conditionally healthy individuals submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nurana F. Nuralieva  
Dmitriya Ulyanova, 11, Moscow, 117292, Russia; nnurana@yandex.ru

**Received:** 02.04.2025 **Accepted:** 16.04.2025 **Published online:** 23.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.020

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Целиакия — аутоиммунное заболевание (АИЗ), обусловленное непереносимостью глютена у генетически предрасположенных лиц и характеризующееся повреждением слизистой оболочки тонкой кишки. Клинически целиакия проявляется диареей, потерей веса, а также задержкой роста и развития у детей. Необходимо отметить, что классические гастроинтестинальные симптомы (абдоминальная боль, тошнота, метеоризм) при целиакии в настоящее время встречаются реже, в связи с изменением морфогенеза заболевания за последние 30 лет. Нередко целиакия имеет атипичное течение и манифестирует поражением кожи, репродуктивными нарушениями и неврологическими проявлениями [1]. Хорошо известно о частой ассоциации целиакии с другими АИЗ, такими как сахарный диабет 1-го типа (СД1), аутоиммунный тиреоидит (АИТ), аутоиммунный гепатит, герпетиформный дерматит [2–4], а также с синдромом Шегрена, селективным дефицитом IgA, ювенильным хроническим артритом, аутоиммунным миокардитом [5]. Опубликованы данные о коморбидности целиакии с первичным билиарным циррозом, первичным склерозирующим гепатитом, болезнью Аддисона, витилиго, гнездовой алопецией, дерматомиозитом, периферической нейропатией, ревматоидным артритом и другими АИЗ [6]. Более того, некоторые из перечисленных АИЗ рассматривают в качестве клинических «масок» целиакии, например, гнездовая алопеция [1]. Таким образом, пациенты с АИЗ составляют группу риска по развитию целиакии. С целью своевременной диагностики пациентам с АИЗ требуется проведение скрининга на наличие целиакии. Вместе с тем, лицам с установленной целиакией следует рекомендовать обследование для исключения возможных сопутствующих АИЗ. В частности, в опубликованных исследованиях осуществляется анализ антител (АТ) — маркеров СД1, аутоиммунных тиреопатий, синдрома Шегрена, антинуклеарных, антимитохондриальных АТ, АТ к ДНК, к антигену Смита, нейтрофилам, гладким мышцам, микросомам, париетальным клеткам желудка [7]. Авторами не выявлена более высокая частота носительства АТ, специфичных к АИЗ, у пациентов с целиакией по сравнению со здоровыми участниками. По мнению исследователей, такие результаты обусловлены небольшим числом пациентов и соблюдением ими безглютеновой диеты. Однако в работе выявлена более высокая частота развития сопутствующих АИЗ при целиакии, в отличие от здоровых лиц. Таким образом, авторы делают вывод о необходимости как клинического, так и лабораторного обследования пациентов с целиакией при подозрении на сопутствующее АИЗ, и рекомендуют не ограничиваться исключительно анализом крови на антитела.

Учитывая большое число потенциальных АИЗ, которые могут развиваться у пациента, проведение регулярного скрининга методом иммуноферментного анализа может быть значительно затруднено, в связи с высокой стоимостью и длительностью исследования, а также необходимостью забора большого количества биологического материала. В этой связи с целью оптимизации алгоритма обследования пациентов с целиакией, целесообразно рассмотреть возможность применения мультиплексного иммуноанализа, который позволяет в одном образце крови небольшого объема (5 мкл) получить за короткий промежуток времени информацию о наличии/отсутствии большого числа АТ, специфичных для различных АИЗ. Метод мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа

применяют для диагностики и скрининга целиакии. В настоящее время производят диагностические наборы, позволяющие одновременно определять наличие у пациента АТ к глинадину и тканевой трансглутаминазе (TGМ2) [8, 9], а также АТ к эндомизию [10]. Результаты, полученные при помощи мультиплексного иммуноанализа, соответствуют данным моноплексных методов [10] и характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью [9]. Предполагается, что благодаря преаналитическим, аналитическим и экономическим преимуществам, по мере внедрения мультиплексного иммуноанализа, необходимость в проведении биопсии с целью подтверждения диагноза значительно сократится [8].

С учетом высокого риска развития у одного пациента нескольких АИЗ разработаны диагностические наборы на основе мультиплексного иммуноанализа, которые позволяют исследовать АТ, специфичные не только к целиакии, но и к другим АИЗ. Предложен метод мультиплексного электрохемилюминисцентного анализа для выявления АТ к инсулину, глутаматдекарбоксилазе (GAD), тирозинфосфатазы (IA2), тканевой трансглутаминазе, тиреоидной пероксидазе (ТПО), тиреоглобулину (ТГ), ИФН-альфа [11]. Вместе с тем, нет опубликованных работ, оценивающих частоту носительства АТ, включая специфичные для эндокринных АИЗ, у пациентов с целиакией методом мультиплексного иммуноанализа.

Цель настоящей работы — определить частоту носительства антител — маркеров аутоиммунных заболеваний у пациентов с целиакией методами иммуноферментного и мультиплексного иммуноанализа.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Место и время проведения исследования

Исследование проводили в ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы, Национальном медицинском исследовательском центре эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации и Институте молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

Набор материала осуществляли в марте–июне 2023 г., лабораторное обследование проводили в марте–декабре 2023 г., анализ результатов — в январе–июне 2024 г.

### Исследуемые когорты

#### *Когорта пациентов с целиакией (группа 1)*

Критерии включения: мужской или женский пол; возраст 18 лет и старше; верифицированный на основании клинических, иммунологических и инструментальных данных диагноз целиакии (согласно данным предоставленной медицинской документации). Критерии исключения: беременность, период лактации; острые инфекции; обострение хронических заболеваний; тяжелые, угрожающие жизни состояния (декомпенсация хронической сердечной недостаточности, хроническая болезнь почек С3б и более, легочная и печеночная недостаточность); патология иммунной системы (включая врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании); прием в течение месяца перед включением в исследование препаратов, влияющих на

функцию иммунной системы (интерлейкины, интерфероны, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики); проведение вакцинации/ревакцинации в течение месяца перед включением в исследование (согласно данным предоставленной медицинской документации).

#### *Когорта условно здоровых участников (группа 2)*

Критерии включения: мужской или женский пол, возраст 18 лет и старше, отсутствие субклинического/ манифестного аутоиммунного заболевания (согласно данным предоставленной медицинской документации). Критерии исключения: симптомы целиакии (диарея, анемия, потеря веса), беременность, период лактации; острые инфекции; обострение хронических заболеваний; тяжелые, угрожающие жизни состояния (декомпенсация хронической сердечной недостаточности, хроническая болезнь почек СЗб и более, легочная и печеночная недостаточность; патология иммунной системы, в том числе врожденные и приобретенные иммунодефицитные состояния; реакции гиперчувствительности в период участия в исследовании); прием препаратов, влияющих на функцию иммунной системы (интерлейкины, интерфероны, иммуноглобулины, иммунодепрессанты, цитостатики), в течение месяца перед включением в исследование; проведение вакцинации/ревакцинации в течение месяца перед включением в исследование.

В группу 1 включено 27 пациентов от 29 до 51 года (медианный возраст — 36 лет), из них 17 (63%) — женщины. В группу 2 включено 16 участников в возрасте от 30 до 52 лет (медианный возраст — 41 год), из них 12 (75%) — женщины. Длительность заболевания на момент включения в исследование у пациентов группы 1 составила 7 [3; 21], (1, 36) лет. В группе 1 сопутствующие АИЗ диагностированы у трех пациентов (11%), в том числе аутоиммунный тиреоидит (АИТ) — у двоих (7%) и гипопаратиреоз — у одного (4%).

#### **Способ формирования выборок из нескольких изучаемых когорт**

Применяли сплошной способ формирования выборок.

#### **Дизайн исследования**

Многоцентровое интервенционное одномоментное двухвыборочное сравнительное исследование.

#### **Методы**

##### *Критерии установления диагноза целиакии*

Диагноз целиакии устанавливали на основании комплексного обследования пациентов с учетом клинической картины заболевания, повышенных серологических маркеров (уровень антител к тканевой трансглутаминазе (IgA и IgG) выше референсных значений), а также морфологической картины слизистой оболочки тонкой кишки (признаки гиперрегенераторной атрофии слизистой оболочки тонкой кишки по классификации Марша–Оберхубера) в соответствии с рекомендациями всероссийского консенсуса по диагностике и лечению целиакии у взрослых и детей [4].

Всем включенным в исследование проводили определение АТ-маркеров АИЗ методами ИФА, хемилюминесцентного

анализа и мультиплексного иммуноанализа на основе гидрогелевого биочипа.

##### *Иммуноферментный анализ*

В рамках скрининга сопутствующих АИЗ всем включенным пациентам выполняли исследование уровня АТ — маркеров АИТ (к ТПО, ТГ), сахарного диабета 1-го типа (к GAD, островковым клеткам поджелудочной железы (ICA), IA2), аутоиммунной надпочечниковой недостаточности (к 21-гидроксилазе (P450c21)), аутоиммунного гастрита (внутреннему фактору Кастла), целиакии (уровень IgA АТ к тканевой TGM2).

Забор крови производили в вакуумные пробирки с инертным гелем из кубитальной вены утром в период с 08:00 до 10:00 в состоянии натощак (голодание в течение не менее 8 ч и не более 14 ч до забора). Полученные пробы центрифугировали не позднее чем через 15 мин после забора с использованием центрифуги Eppendorf 5810R (Eppendorf, США) при температуре 4 °С на скорости 3000 оборотов в минуту в течение 15 мин и затем обрабатывали. Определение уровня АТ к ТПО и ТГ проводили в день взятия крови. Образцы сыворотки для последующего определения уровней АТ к P450c21, GAD, IA2, ICA, внутреннему фактору Кастла и тканевой TGM2 подлежали временной заморозке в микропробирках при температуре –80 °С. Определение АТ к ТГ проводилось на электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas 6000 (Roche, Германия), АТ к ТПО — методом хемилюминесцентного иммуноанализа на автоматическом анализаторе Architect i2000 (Abbott, США). Определение АТ к P450c21, IA-2, GAD, ICA, внутреннему фактору Кастла, тканевой TGM2 осуществляли методом ИФА с использованием коммерческих наборов (BioVendor, Чехия (АТ к P450c21); Medipan, Германия (АТ к IA-2); Biomerica, США (АТ к GAD, ICA); Orgentec Diagnostika, Германия (АТ к внутреннему фактору Кастла); Хема, Россия (АТ к тканевой TGM2, общий IgA)). Референсные интервалы иммунологических показателей крови составляли: АТ к P450c21 — < 0,4 Ед/мл, ТПО — 0–5,6 МЕ/мл, ТГ — 0–115 МЕ/мл, GAD — < 1 Ед/мл (1–1,05 — «серая зона», > 1,05 — положительный уровень), IA2 — < 8 Ед/мл (8–10 — «серая зона», ≥ 10 — положительный уровень), ICA — < 0,95 Ед/мл (0,95–1,05 — «серая зона», > 1,05 — положительный уровень), внутреннему фактору Кастла — < 6 Ед/мл, IgA АТ к тканевой TGM2 — ≤ 20 Ед/мл, общий IgA — 0,9–5,0 г/л. Показатели в пределах «серой зоны» расценивали как повышенные.

##### *Мультиплексный иммуноанализ на основе гидрогелевого биочипа*

Гидрогелевые биочипы изготавливали методом сополимеризационной иммобилизации на основе технологии гидрогелевых биочипов, разработанной в ИМБ РАН. Созданный и апробированный ранее биочип [12], позволяющий выявлять как органоспецифические АТ (АТ к P450c21, АТ к GAD, АТ к IA-2, АТ к ICA, АТ к ТГ и АТ к ТПО), так и АТ против цитокинов (АТ к ИНФ-омега, АТ к ИНФ-альфа и АТ к интерлейкину 22) был модифицирован для выявления антител IgA к тканевой TGM2. С этой целью на биочип были добавлены гидрогелевые элементы, содержащие тканевую TGM2 (R&D Systems, США). Для одновременного выявления антител классов G и A в качестве детектирующих использовали смесь антител против IgG человека, меченных флуоресцентным красителем Cy5.5, и

Таблица 1. Уровни исследованных методом иммуноферментного анализа антител и частота их повышения в группах 1 и 2

Уровень антител***				Частота повышения, n (%)			
Антитела	Группа 1	Группа 2	$p^*$	Антитела	Группа 1	Группа 2	$p^{**}$
	$n = 27$	$n = 16$			$n = 27$	$n = 16$	
к ТПО, МЕ/мл	0,8 [0,5; 4,1]	0,5 [0,3; 2,0]	0,315	к ТПО	6 (22)	3 (19)	0,907
к ТГ, МЕ/мл	16,4 [13,6; 83,1]	14,0 [12,2; 18,2]	0,149	к ТГ	5 (19)	2 (13)	0,929
к GAD, Ед/мл	0,5 [0,5; 0,8]	0,5 [0,4; 0,8]	0,734	к GAD	5 (19)	3 (19)	0,699
к IA2, Ед/мл	3,6 [1,0; 8,4]	1,0 [1,0; 9,5]	0,792	к IA2	8 (30)	6 (38)	0,595
ICA, Ед/мл	0,4 [0,3; 0,5]	0,3 [0,3; 0,5]	0,49	ICA	2 (7)	0	0,715
к P450c21, Ед/мл	0,1 [0,1; 0,1]	0,1 [0; 0,1]	0,866	к P450c21	0	0	–
к внутреннему фактору Кастла, Ед/мл	3,2 [0; 4,6]	1,7 [1,1; 2,6]	0,253	к внутреннему фактору Кастла	4 (15)	–	–
к TGM2, Ед/мл	1,2 [0,7; 3,5]	0,9 [0,6; 1,5]	0,125	к TGM2	0	0	–
				Минимум одно АТ	20 (74)	10 (63)	0,424

**Примечания:** \* —  $U$ -критерий Манна–Уитни. Пороговый  $p_0 = 0,004$  (после применения поправки Бонферрони: 14 сравнений). \*\* — тест Хи-квадрат и тест Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый  $p_0 = 0,004$  (после применения поправки Бонферрони: 14 сравнений). \*\*\* — Медианное значение,  $[Q_1; Q_3]$ . ТПО — тиреоидная пероксидаза; ТГ — тиреоглобулин; GAD — глутаматдекарбоксилаза; ICA — антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IA2 — тирозинфосфатаза; P450c21 — 21-гидроксилаза, TGM2 — тканевая транслгтуминаза.

антител против IgA человека, меченных флуоресцентным красителем Cy3. Конъюгаты F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов антител козы к иммуноглобулину G человека (Invitrogen, США) и F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов антител козы к иммуноглобулину A человека (Invitrogen, США) получали согласно методике производителя флуоресцентных красителей Cy5.5 и Cy3, соответственно («Люмипроб РУС», Россия). Регистрацию флуоресцентных изображений биочипов и вычисление флуоресцентных сигналов получали с помощью анализатора и программного обеспечения (ИМБ РАН, Россия). Интерпретацию результатов анализа на биочипе с установлением наличия/отсутствия АТ в сыворотке крови проводили, как описано ранее [12].

### Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартных методов статистического анализа с использованием пакетов программного обеспечения: STATISTICA 13 (StatSoft, США, 2017) и MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия, 2020). Для количественных признаков указывали медиану и интерквартильный интервал. Так как распределение признаков было отличным от нормального, применяли непараметрические тесты. С целью сравнения количественных данных двух независимых выборок применяли  $U$ -критерий Манна–Уитни; качественных признаков — тест Хи-квадрат и Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Критический уровень статистической значимости при проверке статистических гипотез был принят равным 0,05. Для коррекции проблемы множественности проверки гипотез применяли поправку Бонферрони. После применения поправки значения  $p$  в диапазоне между рассчитанным и 0,05 интерпретировали как статистическую тенденцию.

Многочисленный анализ сигналов, полученных по результатам исследования образцов сыворотки крови на биочипах, соответствующих уровням аутоантител, с учетом наличия или отсутствия диагноза «целиакия», проводили с использованием метода решающих деревьев для построения одиночного дерева по алгоритму классификации и регрессии (CART). Полученное разбиение на классы по спектру значений сигналов анализировали с помощью точного теста Фишера для проверки гипотезы об

однородности. Затем с помощью точного теста Фишера для парных сравнений с применением поправок Бонферрони проводили апостериорные сравнения (post-hoc анализ). Вычисления и построение рисунков производили с помощью языка R с использованием пакетов rpart версии 4.1.24, rpart.plot версии 3.1.2, ggplot2 версии 3.5.1, rstatix версии 0.7.2.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значимых отличий по возрасту ( $p = 0,372$ ) и полу ( $p = 0,633$ ) между группами не выявлено. Уровни АТ, исследованных методом ИФА, и частота их повышения представлены в табл. 1. Повышение IgA к тканевой TGM2 не выявлено ни у одного из участников исследования. В группе 1 у семи (26%) пациентов не выявлено повышение АТ, повышение одного АТ отмечено у 13 (48%) пациентов, двух АТ — у пяти (19%), трех АТ — у одного (4%), четырех АТ — у одного (4%). В группе 2 у шести (38%) обследуемых не выявлено повышение АТ, повышение одного АТ отмечено у восьми (50%) лиц, двух АТ — у 1 (6%), четырех АТ — у одного (6%). Медианные значения уровня общего IgA методом ИФА у пациентов с целиакией составили 1,1 г/л [95% ДИ: 0,9; 1,5], в группе здоровых — 1,1 г/л [95% ДИ 1,0; 1,4]. У одного пациента группы 1 уровень общего IgA был ниже предела обнаружения (< 0,06 г/л).

Значения сигналов элементов биочипа, соответствующие уровням исследованных АТ, полученные методом мультиплексного иммуноанализа, и частота их повышения представлены в табл. 2. Антитела к TGM2 (TGM2-IgA) также не выявлены ни у одного из участников исследования. В группе 1 у 18 (66%) пациентов АТ не выявлены, наличие одного АТ отмечено у восьми (30%) пациентов, двух АТ — у одного (4%). В группе 2 АТ не выявлены у 12 (75%) обследуемых, одно АТ обнаружено у троих (19%), три АТ — у одного (6%).

Среди всей исследуемой когорты ( $n = 43$ ) выявлено восемь носителей АТ (18,6%), для которых было обнаружено более одного АТ к целевой группе белков и/или выявленные АТ подтверждены двумя методами: два носителя АТ против белков-маркеров сахарного диабета — пациент с целиакией и здоровый; шесть носителей антитиреоидных АТ — пять пациентов с целиакией без установленного диагноза АИТ и один

**Таблица 2.** Значения сигналов элементов биочипа, соответствующие уровням исследованных АТ, полученные методом мультиплексного иммуноанализа, и частота их повышения в группах 1 и 2

Значения сигналов элементов биочипа, отн. ед.***				Частота повышения, n (%)			
Антитела	Группа 1	Группа 2	$p^*$	Антитела	Группа 1	Группа 2	$p^{**}$
	n = 27	n = 16			n = 27	n = 16	
к ТПО	1,1 [0,9; 1,4]	1,4 [1,0; 1,8]	0,247	к ТПО	3 (11)	2 (13)	0,383
к ТГ	0,8 [0,7; 1,0]	0,95 [0,7; 1,2]	0,496	к ТГ	3 (11)	1 (6)	0,446
к GAD	1,0 [0,9; 1,1]	0,9 [0,8; 1,0]	0,126	к GAD	0	0	–
к IA2	1,0 [0,9; 1,0]	0,9 [0,8; 1,1]	0,724	к IA2	0	0	–
ICA	1,0 [0,9; 1,3]	1,4 [0,8; 2,1]	0,358	ICA	1 (4)	2 (13)	0,37
к P450c21	0,9 [0,8; 1,0]	1,1 [0,8; 1,9]	0,097	к P450c21	1 (4)	0	0,297
к ИФН-омега	1,0 [0,7; 1,1]	0,85 [0,5; 1,0]	0,529	к ИФН-омега	0	0	–
к ИФН-альфа	0,9 [0,8; 1,2]	1,2 [0,9; 1,7]	0,346	к ИФН-альфа	1 (4)	1 (6)	0,31
к ИЛ-22	1,0 [1,0; 1,3]	0,9 [0,8; 1,1]	0,449	к ИЛ-22	0	0	–
к TGM-2 (IgA)	1,1 [0,9; 1,1]	0,8 [0,3; 1,2]	0,065	к TGM-2 (IgA)	0	0	–
				Минимум одно АТ	8 (30)	3 (19)	0,668

**Примечания:** \* — *U*-критерий Манна–Уитни. Пороговый  $p_0 = 0,003$  (после применения поправки Бонферрони: 16 сравнений). \*\* — тест Хи-квадрат и тест Хи-квадрат с поправкой Йейтса. Пороговый  $p_0 = 0,003$  (после применения поправки Бонферрони: 16 сравнений). \*\*\* — Медианное значение,  $[Q_1; Q_3]$ . ТПО — тиреоидная пероксидаза; ТГ — тиреоглобулин; GAD — глутаматдекарбоксилаза; ICA — антитела к островковым клеткам поджелудочной железы; IA2 — тирозинфосфатаза; P450c21 — 21-гидроксилаза; ИФН (интерферон); ИЛ-22 (интерлейкин 22), TGM2 — тканевая трансглутаминаза

условно здоровый пациент без установленного диагноза АИТ. Для двух пациентов с помощью мультиплексного анализа установлено носительство АТ к интерферону альфа (условно здоровый пациент с МЭН-1 и пациент с целиакией). У четырех пациентов с целиакией методом ИФА выявлены АТ к внутреннему фактору Кастла, ассоциированные с аутоиммунным гастритом.

В силу того что ни одним из методов не выявлен повышенный уровень антител IgA к тканевой TGM2 у пациентов с целиакией, нами был проведен многопараметрический анализ сигналов элементов биочипа по результатам анализа образцов сыворотки крови исследуемых групп. На основании входного массива сигналов, полученных на биочипах, соответствующих различным уровням десяти исследуемых АТ, построено дерево классификации и регрессии (CART) (рис. 1).

Полученное дерево показывает вероятность наличия у пациента диагноза «целиакия» с точностью 0,92 в случае, если соблюдаются два условия: значение TGM2-IgA 0,57

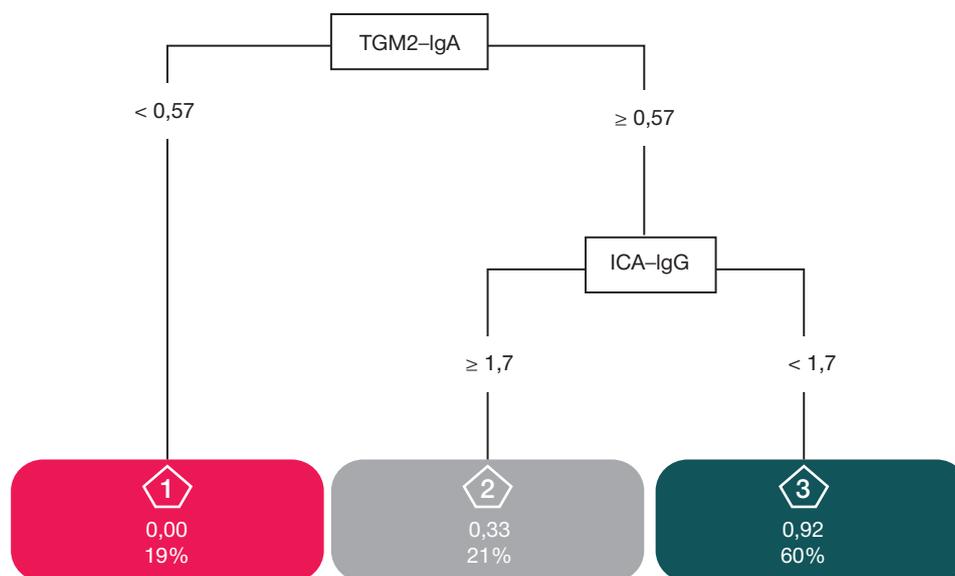
и значение ICA-IgG < 1,7. Распределение пациентов по классам построенного дерева в зависимости от диагноза «целиакия» (рис. 2, табл. 3) было проанализировано с помощью точного критерия Фишера. Полученное значение  $p$  составило < 0,0001.

Результаты апостериорных сравнений с использованием точного теста Фишера с применением поправок Бонферрони (табл. 4) свидетельствуют о различии на уровне значимости  $p < 0,005$  в классах 2 и 3 и в классах 1 и 3. Различие между классами 1 и 2 несущественно.

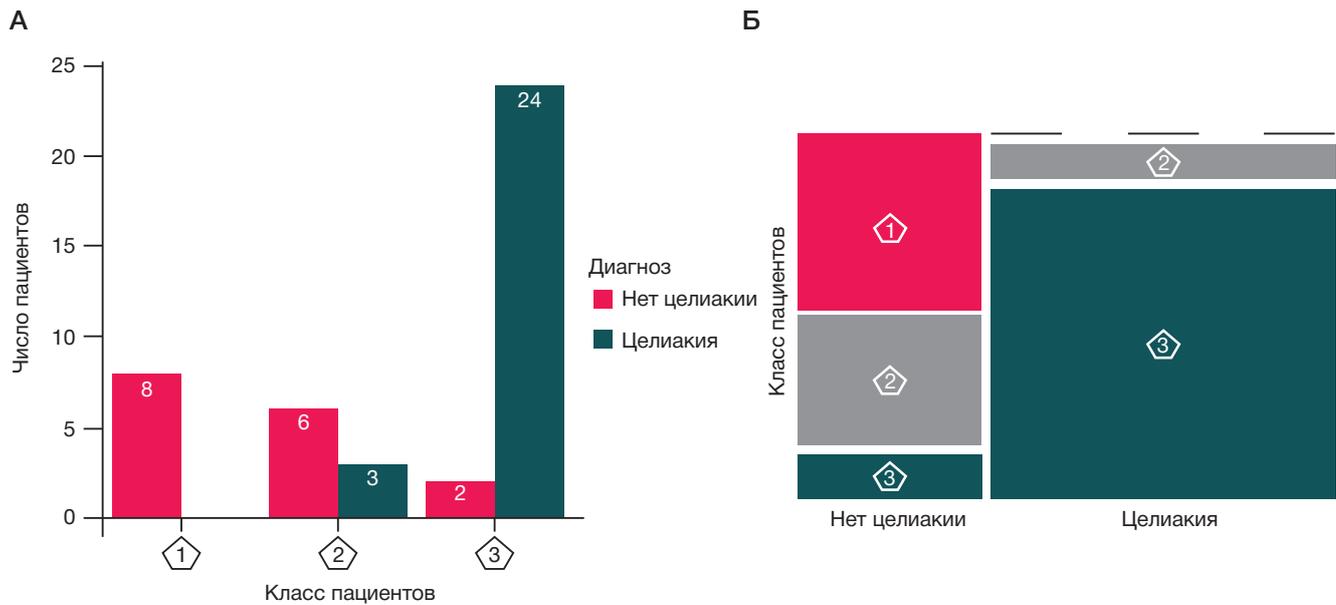
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выборку пациентов с целиакией можно считать репрезентативной по полу (отмечается преобладание женщин) и возрасту манифестации заболевания.

В настоящем исследовании не выявлено повышения АТ к тканевой TGM2 ни в одном образце. Среди причин возможных ложноотрицательных серологических тестов при



**Рис. 1.** Дерево классификации и регрессии (CART). В каждом концевом узле дерева (листе) указано название выделенного класса (здесь: 1, 2, 3), вероятность диагноза «целиакия» (здесь: 0,00, 0,33, 0,92), доля пациентов в классе в сравнении со всей выборкой (здесь: 19%, 21%, 60%)



**Рис. 2.** Распределение пациентов по классам и наличию диагноза «целиакия» в виде столбчатой а) и мозаичной б) диаграмм. Соответствующие классы обозначены цифрами в пятиугольниках

целиакии выделяют селективный дефицит IgA, уменьшение или исключение глютена из рациона, использование кортикостероидов или иммунодепрессантов [13].

Для исключения дефицита IgA у пациентов и здоровых доноров методом ИФА определяли уровень общего IgA в сыворотке крови. У одного пациента группы 1 (мужчина, 33 года) с помощью ИФА был выявлен дефицит IgA: уровень общего IgA был ниже предела обнаружения. Остальные пациенты группы 1 обладали уровнем общего IgA в пределах нормы, что также наблюдали и для группы 2. Целиакия является аутоиммунным заболеванием, ассоциированным с дефицитом IgA. Тем не менее данные о частоте дефицита IgA среди пациентов с целиакией в разных популяциях варьируются в широких пределах — от 0,55 до 16,67% [16]. Результаты исследуемой выборки пациентов соответствуют ранее опубликованным данным (дефицит IgA выявлен у одного из 27 пациентов; 3,7%). Таким образом, так как отсутствует дефицит иммуноглобулина A у 26 из 27 пациентов, отрицательные результаты тестирования IgA к тканевой TGM2 обусловлены длительным анамнезом целиакии и приверженностью к безглютеновой диете у большинства пациентов.

АИТ у пациентов с целиакией на момент включения в настоящее исследование встречался только в 7% случаев ( $n = 2$ ). У одного из этих пациентов методом ИФА выявлено повышение как АТ к ТГ, так и АТ к ТПО, тогда как при мультиплексном анализе данных АТ выявлено не было. У второго пациента оба метода выявили повышение исключительно АТ к ТГ. Согласно результатам других авторов, частота АИТ у пациентов с целиакией составляет 5,7–18,9% [15, 16]. С учетом молодого возраста пациентов, высокой частотой повышения антител к ТПО и ТГ (методом ИФА частота повышения АТ к ТПО и ТГ оставляет 22% и 19% соответственно), высоковероятно, что частота АИТ в данной группе будет возрастать со временем.

У одного из пациентов диагностирован гипопаратиреоз. В литературе сочетание целиакии с гипопаратиреозом описано в единичных случаях. Предполагается, что гипопаратиреоз не является первичным, а развивается вследствие перекрестной реактивности АТ к эндомизию с антигенами околощитовидных желез [17]. Необходимо отметить, что у данного пациента также диагностирован сахарный диабет на фоне сниженного уровня С-пептида и нормальных уровней АТ к инсулину, GAD, IA2, транспортеру цинка 8 (ZnT8), ICA (исследование расширенной панели АТ-маркеров СД1 проведено до включения в исследование). Таким образом, аутоиммунный генез заболевания не подтвержден. Ранее проведенное генетическое обследование установило наличие патогенной мутации в гене GSK, что подтверждает MODY-диабет. Повышения АТ к внутреннему фактору Кастла, P450c21, ИФН-альфа и ИФН-омега у данного пациента не выявлено. В отношении АТ к ткани щитовидной железы получены неоднозначные результаты — уровни АТ к ТГ, измеренные двумя методами, были в пределах нормальных значений, как и уровень АТ к ТПО, выявленный при ИФА, тогда как методом мультиплексного анализа определен уровень АТ к ТПО в пределах «серой зоны». Анамнез пациента примечателен развитием подострого тиреоидита, требовавшего назначения преднизолона, однако на момент забора крови лечение было завершено (подтвержден эутиреоз).

Отметим, что частота сопутствующих АИЗ в нашем исследовании (11%) меньше по сравнению с опубликованными ранее данными [13]: 33,7% пациентов имели, по крайней мере, одно АИЗ, из них 8,1% — множественную аутоиммунную патологию; наиболее часто встречались АИТ (18,9%), реже СД1 (13,5%) и прочие. Возможно, это обусловлено небольшим числом участников в нашем исследовании.

**Таблица 3.** Распределение пациентов по классам в зависимости от сигналов, полученных на биочипах, и наличия диагноза «целиакия»

Диагноз «целиакия»	Класс 1	Класс 2	Класс 3
Да	0	3	24
Нет	8	6	2

Таблица 4. Результаты парного сравнения классов

Классы	<i>p</i>	<i>p</i> -скорректированное*
1 и 2	0,206	0,618
1 и 3	0,00000248	0,00000744
2 и 3	0,0012	0,0036

Примечания: \* — *p*-значение с поправкой Бонферрони

Методом ИФА, как и методом мультиплексного анализа, нами не обнаружено значимых отличий в частоте повышения АТ-маркеров эндокринных и неэндокринных АИЗ при сравнении групп. Аналогичные результаты описаны в литературе, когда проводили оценку частоты носительства АТ к ТПО, ТГ, GAD, ICA у пациентов с целиакией и здоровых участников [7]. Вместе с тем, есть сообщения о более высокой частоте АТ к GAD у пациентов с целиакией [18]. Необходимо отметить, что частота повышения АТ к ТПО у пациентов с целиакией значительно варьирует, по данным разных авторов, и составляет от 3,9 до 30,5% [7, 13, 19, 20–22], что, вероятно, обусловлено различиями в возрасте участников, а также чувствительности диагностических наборов. Частота повышения АТ к ТГ при целиакии, согласно литературным данным, составляет 11,2–11,7% [20, 23], к GAD — 0–13,5% [7, 13, 18, 19, 24], к IA2 — 1–1,25% [18, 19], к париетальным клеткам желудка — 10,9% [19], к P450c21 — 2,2% [19].

В обследованной нами когорте пациентов с целиакией частота повышения АТ значительно превышала аналогичные данные, полученные в другой работе: 13 (17,6%) из 74 обследованных пациентов были носителями одного АТ, 9 (12,2%) — носителями двух и более АТ [15]. Однако необходимо отметить, что авторы анализировали исключительно АТ к GAD, ТПО и антинуклеарные АТ. В исследовании других авторов носительство как минимум одного АТ зафиксировано у 31,5% из 92 обследованных пациентов (в работе проведено определение АТ к инсулину, GAD, IA2, ZnT8, ТПО, париетальным клеткам желудка, P450c21) [19]. В отличие от нашего исследования, в этой работе носительство по крайней мере одного АТ при целиакии встречалось значимо чаще, чем в когорте здоровых лиц (обследовано 237 участников). Авторы отмечают, что частота носительства АТ увеличивается с возрастом: так, в группе 34–50 лет повышенный уровень АТ встречается в 34,8% случаев, тогда как у пациентов 18–34 лет — в 28,3% случаев. В нашей когорте у одного пациента из группы 1 с помощью мультиплексного анализа выявлены АТ к P450c21 (2,8 отн. ед.), что может быть также связано с возрастом, составляющим 76 лет.

С помощью мультиплексного анализа, помимо органо-специфических АТ, исследованы АТ к интерферонам I типа (ИНФ-альфа и ИНФ-омега) и интерлейкину 22. Ни у одного пациента из групп 1 и 2 не выявлены АТ к интерлейкину 22, ассоциированные с кожно-слизистым кандидозом, и АТ к ИНФ-омега. Высокие титры АТ к интерферонам I типа, высокоспецифичные для аутоиммунного полигландулярного синдрома 1-го типа, могут быть выявлены также у пациентов с некоторыми другими заболеваниями, в том числе с системной красной волчанкой, миастенией, опухолью вилочковой железы [25]. АТ к ИНФ-альфа обнаружены в довольно низком титре (2,5 отн. ед.) у одного пациента с целиакией, у которого другие антитела были в пределах референсных значений и данных за сопутствующие АИЗ не получено. АТ к ИНФ-альфа

(5,6 отн. ед.) выявлены также у одного пациента из группы 2 с синдромом множественных эндокринных неоплазий 1-го типа (МЭН-1), включающего гиперпаратиреоз и инсулиному. Примечательно, что в нашей ранее опубликованной работе [12] также сообщалось о пациенте-носителе АТ к ИНФ-альфа с синдромом МЭН-1, компонентами которого были в том числе инсулинома и гиперпаратиреоз. Эти данные требуют подтверждения. Важно также добавить еще одну особенность, характерную для носительства АТ к ИНФ-альфа: как было показано в ранее опубликованном нами исследовании, оно ассоциировано с рисками тяжелого течения COVID-19 [26].

Отсутствие значимых различий в частоте повышения АТ в группах 1 и 2 может быть обусловлено ограниченной численностью групп наблюдения и свидетельствовать о высокой распространенности потенциальных форм АИЗ в обследованных когортах, а также подтверждает условность термина «здоровый».

Как при помощи ИФА, так и при помощи мультиплексного иммуноанализа, наиболее часто в группе 1 выявлялись маркеры СД1 и АИТ, что согласуется с литературными данными о высоком риске развития данных патологий при целиакии [6]. Важно отметить, что при помощи ИФА, который рассматривается в настоящее время в клинической практике в качестве «золотого стандарта», носительство АТ выявлялось чаще, чем при помощи мультиплексного иммуноанализа как в группе 1, так и в группе 2. Однако в трех случаях мультиплексный иммуноанализ позволил выявить носительство АТ (к P450c21 в группе 1 у одного пациента и к ICA в группе 2 у двух участников) при отрицательном результате, полученном методом ИФА. При гормональном обследовании пациентов с повышенными АТ признаков гипокортицизма и СД1 не обнаружено, однако мы продолжили динамическое наблюдение за данными участниками (так как не исключено развитие АИЗ в отсроченном периоде), чтобы корректно оценить прогностическую значимость полученного результата.

Таким образом, поскольку результаты определения того или иного показателя различными иммунологическими методами могут различаться, выявление у пациента без клинических признаков заболевания одного АТ при скрининговом исследовании требует проведения уточняющих тестов.

В связи со сложностью анализа многомерных данных и неочевидностью получаемых выводов требуется применение математических методов для интерпретации таких массивов данных. Методы решающих деревьев и, в частности, алгоритм дерева классификации и регрессии CART используют в анализе медицинских данных, благодаря их способности обнаруживать сложные взаимодействия между переменными и предоставлять визуально интерпретируемые результаты [27]. В проведенной работе были проанализированы десятимерные массивы данных в виде значений сигналов биочипа для 43 пациентов. Показано, что при проведении мультиплексного анализа

на биочипах можно относить пациентов к одному из трех классов, в которых третий статистически значимо ( $p < 0,005$ ) отличается от первого и второго по частоте обнаружения участников с целиакией. При этом в первый класс вошли только здоровые обследуемые, во второй класс вошли и здоровые и пациенты с целиакией с результатами теста, входящего в условную «серую зону», а третий класс составили 89% пациентов с целиакией и два (12,5%) участника группы 2. Следует отметить, что у одного условно здорового пациента, отнесенного к третьему классу, были диагностированы идиопатический гипопаратиреоз и синдром Фара. Второй условно здоровый индивид является носителем антител к глинадину. Однако повышение данных антител является неспецифическим и не служит основанием для диагностики целиакии.

Введение новых подходов для исключения целиакии у лиц, соблюдающих безглютеновую диету, является в настоящее время актуальной задачей, для решения которой разрабатываются специальные методы [28]. Снижение уровня различных аутоантител у пациентов с целиакией, соблюдающих безглютеновую диету, было показано ранее [29, 30]. В частности, безглютеновая диета у пациентов с целиакией ассоциирована с уменьшением или исчезновением островково-специфических аутоантител, в том числе ICA-IgG [30]. Для нашей выборки было показано снижение значений ICA-IgG и P450c21-IgG (данные не представлены) для пациентов с целиакией по сравнению с группой здоровых лиц. Включение в алгоритм CART значений ICA-IgG наряду со значениями TGM2-IgA дало

наилучшее разделение пациентов по классам в зависимости от наличия диагноза «целиакия» с точностью 0,92.

## ВЫВОДЫ

Отсутствие АТ-маркеров к тканевой TGM2 у пациентов с целиакией может быть обусловлено длительностью течения заболевания и приверженностью к безглютеновой диете. Частота повышения АТ-маркеров эндокринных АИЗ у пациентов с целиакией значимо не отличается от данного показателя у здоровых лиц. Отсутствие значимых различий в частоте повышения АТ в группах пациентов с целиакией и здоровых участников может быть обусловлено ограниченной численностью групп наблюдения и свидетельствовать о высокой распространенности потенциальных форм АИЗ в данных когортах, а также подтверждает условность термина «здоровый». У пациентов с носительством АТ по данным мультиплексного иммуноанализа при отрицательном результате ИФА не исключается развитие АИЗ в отсроченном периоде, что позволит предположить прогностическую значимость метода мультиплексного иммуноанализа. Многопараметрический анализ маркеров аутоиммунных заболеваний, полученных на биочипах, показал возможность установления диагноза «целиакия» пациентам, соблюдающим безглютеновую диету, в случаях, когда уровень антител к тканевой TGM2 в пределах нормы. Таким образом, показано, что метод мультиплексного иммуноанализа может быть применен как на этапе верификации диагноза целиакии, так и для скрининга органоспецифических АТ в крови у пациентов с АИЗ.

## Литература

1. Ахмедова Э. Ф., Белинская В. А. Гнездная алопеция как основное проявление целиакии. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022; 205 (9): 303–07. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-205-9-303-307.
2. Быкова С. В., Сабельникова Е. А., Задиран Е. И., Парфенов А. И. Осведомленность врачей о целиакии: результаты опроса. Эффективная фармакотерапия. 2021; 17 (16): 92–100. DOI: 10.33978/2307-3586-2021-17-16-92-100.
3. Парфенов А. И. Целиакия (болезнь Ги–Гертера–Гейбнера). М.: Медицинское информационное агентство, 2023; 488 с.
4. Парфенов А. И., Быкова С. В., Сабельникова Е. А., Маев И. В., Баранов А. А., Бакулин И. Г. и др. Всероссийский консенсус по диагностике и лечению целиакии у детей и взрослых. Терапевтический архив. 2017; 89 (3): 94–107. DOI: 10.17116/terarkh201789394-107.
5. Kocsis D, Csaplár M, Jócsák E, Pák P, Tóth Z, Miheller P, et al. Celiac disease association with other autoimmune disorders: Three case reports. Case Reports in Internal Medicine. 2015; 2 (1): 23–29. DOI: 0.5430/crim.v2n1p23.
6. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. Biomed Research International. 2013; 2013: 127589. DOI: 10.1155/2013/127589.
7. Caglar E, Ugurlu S, Ozenoglu A, Can G, Kadioglu P, Dobrucali A. Autoantibody frequency in celiac disease. Clinics. 2009; 64 (12): 1195–200. DOI: 10.1590/S1807-59322009001200009.
8. Lochman I, Martis P, Burlingame RW, Lochmanová A. Multiplex assays to diagnose celiac disease. Annals of the New York Academy of Sciences. 2007; 1109: 330–7. DOI: 10.1196/annals.1398.039.
9. Holding S, Wilson F, Spradbery D. Clinical evaluation of the BioPlex 2200 Celiac IgA and IgG Kits — a novel multiplex screen incorporating an integral check for IgA deficiency. Journal of Immunological Methods. 2014; 405: 29–34. DOI: 10.1016/j.jim.2014.01.002.
10. Abdukhakimova D, Dossybayeva K, Grechka A, Almukhamedova Z, Boltanova A, Kozina L, et al. Reliability of the multiplex CytoBead CeliAK immunoassay to assess Anti-tTG IgA for celiac disease screening. Frontiers in Medicine. 2021; 8: 731067. DOI: 10.3389/fmed.2021.731067.
11. Gu Y, Zhao Z, Waugh K, Miao D, Jia X, Cheng J, et al. High-throughput multiplexed autoantibody detection to screen type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases simultaneously. EBioMedicine. 2019; 47: 365–72. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.08.036.
12. Savvateeva EN, Yukina MY, Nuralieva NF, Filippova MA, Gryadunov DA, Troshina EA. Multiplex autoantibody detection in patients with autoimmune polyglandular syndromes. International Journal of Molecular Sciences. 2021; 22 (11): 5502. DOI: 10.3390/ijms22115502.
13. Rashid M, Lee J. Serologic testing in celiac disease: Practical guide for clinicians. Canadian Family Physician. 2016; 62 (1): 38–43.
14. Odineal DD, Gershwin ME. The epidemiology and clinical manifestations of autoimmunity in selective IgA deficiency. Clinical Reviews in Allergy & Immunology. 2020; 58 (1): 107–33. DOI: 10.1007/s12016-019-08756-7.
15. Gupta V, Singh A, Makharia GK. Prevalence of auto-antibodies and autoimmune disorders in patients with celiac disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2020; 55 (7): 785. DOI: 10.1080/00365521.2020.1785544.
16. Volta U, De Franceschi L, Molinaro N, Tetta C, Bianchi FB. Organ-specific autoantibodies in coeliac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology. 1997; 29: 18–21.
17. Patel SR, Shashaty RJ, Denoux P. Nutritional Nightmare: Hypoparathyroidism Secondary to Celiac Disease. The American Journal of Medicine. 2017; 130 (12): e525–e526. DOI: 10.1016/j.amjmed.2017.07.032.
18. Ghozzi M, Souguir D, Melayah S, Abidi S, Faleh M, Ghedira I. Frequency of auto-antibodies of type 1 diabetes in adult patients with celiac disease. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2021; 35 (9): e23941. DOI: 10.1002/jcla.23941.

19. Tiberti C, Panimolle F, Borghini R, Montuori M, Trovato CM, Filardi T, et al. Type 1 diabetes, thyroid, gastric and adrenal humoral autoantibodies are present altogether in almost one third of adult celiac patients at diagnosis, with a higher frequency than children and adolescent celiac patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2020; 55 (5): 549–54. DOI: 10.1080/00365521.2020.1754898.
20. Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *The Journal of Pediatrics*. 2000; 137: 263–65. DOI: 10.1067/mpd.2000.107160.
21. Velluzzi F, Caradonna A, Boy MF, Pinna MA, Cabula R, Lai MA, et al. Thyroid and celiac disease: clinical, serological, and echographic study. *American Journal of Gastroenterology*. 1998; 93: 976–979. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1998.291\_u.x.
22. Carta MG, Hardoy MC, Boi MF, Mariotti S, Carpiniello B, Usai P. Association between panic disorder, major depressive disorder and celiac disease: a possible role of thyroid autoimmunity. *Journal of Psychosomatic Research*. 2002; 53: 789–93. DOI: 10.1016/s0022-3999(02)00328-8.
23. Gaibi S, Mohammad Amini H, Feizollah Zadeh S. Investigating the prevalence of autoimmune thyroid diseases in children with celiac disease in Urmia city, Iran. *Studies in Medical Sciences*. 2023; 34(6): 330–37.
24. Hadjivassiliou M, Aeschlimann D, Grünewald RA, Sanders DS, Sharrack B, Woodroffe N. GAD antibody-associated neurological illness and its relationship to gluten sensitivity. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2011; 123 (3): 175–80. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2010.01356.x.
25. Gupta S, Tatouli IP, Rosen LB, Hasni S, Alevizos I, Manna ZG, et al. Distinct functions of autoantibodies against interferon in systemic lupus erythematosus: a comprehensive analysis of anticytokine autoantibodies in common rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatology*. 2016; 68 (7): 1677–87. DOI: 10.1002/art.39607.
26. Savvateeva E, Filippova M, Valuev-Elliston V, Nuralieva N, Yukina M, Troshina E, et al. Microarray-based detection of antibodies against SARS-CoV-2 proteins, common respiratory viruses and type I interferons. *Viruses*. 2021; 13: 2553. DOI: 10.3390/v13122553.
27. Zimmerman RK, Balasubramani GK, Nowalk MP, Eng H, Urbanski L, Jackson M L, et al. Classification and Regression Tree (CART) analysis to predict influenza in primary care patients. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16 (1): 503. DOI: 10.1186/s12879-016-1839-x.
28. Sarna VK, Lundin KEA, Mørkrid L, Qiao SW, Sollid LM, Christophersen A. HLA-DQ-gluten tetramer blood test accurately identifies patients with and without celiac disease in absence of gluten consumption. *Gastroenterology*. 2018; 154 (4): 886–896. e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.11.006.
29. Elia ZN, Berwary NJA. Effectiveness of a gluten-free diet on the autoantibody frequency of endocrine and neuron disorders in patients with celiac disease. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 2024; 7 (1): 34–43. DOI: 10.5455/jabet.2024.d03.
30. Tiberti C, Montuori M, Trovato CM, Panimolle F, Filardi T, Valitutti F, et al. Gluten-free diet impact on dynamics of pancreatic islet-specific autoimmunity detected at celiac disease diagnosis. *Pediatric Diabetes*. 2020; 21 (5): 774–80. DOI: 10.1111/peidi.13054.

## References

1. Ahmedova JeF, Belinskaja VA. Gnezdhnaja alopecija kak osnovnoe pojavlenie celiakii. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2022; 205 (9): 303–07. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-2025-9-303-307. Russian.
2. Bykova SV, Sabel'nikova EA, Zadiran EI, Parfenov AI. Osvedomlennost' vrachej o celiakii: rezul'taty oprosa. *Jefferktivnaja farmakoterapija*. 2021; 17(16):92–100. DOI: 10.3397/8/2307-3586-2021-17-16-92-100. Russian.
3. Parfenov AI. Celiakija (bolezn' Gi–Gertera–Gejbnera). M.: Medicinskoe informacionnoe agentstvo, 2023; 488 c. Russian.
4. Parfenov AI, Bykova SV, Sabel'nikova EA, Maev IV, Baranov AA, Bakulin IG, i dr. Vserossijskij konsensus po diagnostike i lecheniju celiakii u detej i vzroslyh. *Terapevticheskij arhiv*. 2017; 89 (3): 94–107. DOI: 10.17116/terarkh201789394-107. Russian.
5. Kocsis D, Csaplár M, Jócsák E, Pák P, Tóth Z, Miheller P, et al. Celiac disease association with other autoimmune disorders: Three case reports. *Case Reports in Internal Medicine*. 2015; 2 (1): 23–29. DOI: 0.5430/crim.v2n1p23.
6. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. *Biomed Research International*. 2013; 2013: 127589. DOI: 10.1155/2013/127589.
7. Caglar E, Ugurlu S, Ozenoglu A, Can G, Kadioglu P, Dobrucali A. Autoantibody frequency in celiac disease. *Clinics*. 2009; 64 (12): 1195–200. DOI: 10.1590/S1807-59322009001200009.
8. Lochman I, Martis P, Burlingame RW, Lochmanová A. Multiplex assays to diagnose celiac disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007; 1109: 330–7. DOI: 10.1196/annals.1398.039.
9. Holding S, Wilson F, Spradbery D. Clinical evaluation of the BioPlex 2200 Celiac IgA and IgG Kits — a novel multiplex screen incorporating an integral check for IgA deficiency. *Journal of Immunological Methods*. 2014; 405: 29–34. DOI: 10.1016/j.jim.2014.01.002.
10. Abdulkhakimova D, Dossybayeva K, Grechka A, Almukhamedova Z, Boltanova A, Kozina L, et al. Reliability of the multiplex CytoBead CeliAK immunoassay to assess Anti-tTG IgA for celiac disease screening. *Frontiers in Medicine*. 2021; 8: 731067. DOI: 10.3389/fmed.2021.731067.
11. Gu Y, Zhao Z, Waugh K, Miao D, Jia X, Cheng J, et al. High-throughput multiplexed autoantibody detection to screen type 1 diabetes and multiple autoimmune diseases simultaneously. *EBioMedicine*. 2019; 47: 365–72. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.08.036.
12. Savvateeva EN, Yukina MY, Nuralieva NF, Filippova MA, Gryadunov DA, Troshina EA. Multiplex autoantibody detection in patients with autoimmune polyglandular syndromes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (11): 5502. DOI: 10.3390/ijms22115502.
13. Rashid M, Lee J. Serologic testing in celiac disease: Practical guide for clinicians. *Canadian Family Physician*. 2016; 62 (1): 38–43.
14. Odineal DD, Gershwin ME. The epidemiology and clinical manifestations of autoimmunity in selective IgA deficiency. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2020; 58 (1): 107–33. DOI:10.1007/s12016-019-08756-7.
15. Gupta V, Singh A, Makharia GK. Prevalence of auto-antibodies and autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2020; 55 (7): 785. DOI: 10.1080/00365521.2020.1785544.
16. Volta U, De Franceschi L, Molinaro N, Tetta C, Bianchi FB. Organ-specific autoantibodies in coeliac disease: do they represent an epiphenomenon or the expression of associated autoimmune disorders? *Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 1997; 29: 18–21.
17. Patel SR, Shashaty RJ, Denoux P. Nutritional Nightmare: Hypoparathyroidism Secondary to Celiac Disease. *The American Journal of Medicine*. 2017; 130 (12): e525–e526. DOI: 10.1016/j.amjmed.2017.07.032.
18. Ghazzi M, Souguir D, Melayah S, Abidi S, Faleh M, Ghedira I. Frequency of auto-antibodies of type 1 diabetes in adult patients with celiac disease. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021; 35 (9): e23941. DOI: 10.1002/jcla.23941.
19. Tiberti C, Panimolle F, Borghini R, Montuori M, Trovato CM, Filardi T, et al. Type 1 diabetes, thyroid, gastric and adrenal humoral autoantibodies are present altogether in almost one third of adult celiac patients at diagnosis, with a higher frequency than children and adolescent celiac patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2020; 55 (5): 549–54. DOI: 10.1080/00365521.2020.1754898.
20. Ventura A, Neri E, Ughi C, Leopaldi A, Citta A, Not T. Gluten-dependent diabetes-related and thyroid-related autoantibodies in patients with celiac disease. *The Journal of Pediatrics*. 2000; 137: 263–65. DOI: 10.1067/mpd.2000.107160.
21. Velluzzi F, Caradonna A, Boy MF, Pinna MA, Cabula R, Lai MA, et al. Thyroid and celiac disease: clinical, serological, and echographic study. *American Journal of Gastroenterology*. 1998; 93: 976–979. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1998.291\_u.x.
22. Carta MG, Hardoy MC, Boi MF, Mariotti S, Carpiniello B, Usai P.

- Association between panic disorder, major depressive disorder and celiac disease: a possible role of thyroid autoimmunity. *Journal of Psychosomatic Research*. 2002; 53: 789–93. DOI: 10.1016/s0022-3999(02)00328-8.
23. Gaibi S, Mohammad Amini H, Feizollah Zadeh S. Investigating the prevalence of autoimmune thyroid diseases in children with celiac disease in Urmia city, Iran. *Studies in Medical Sciences*. 2023; 34(6): 330–37.
  24. Hadjivassiliou M, Aeschlimann D, Grünewald RA, Sanders DS, Sharrack B, Woodroffe N. GAD antibody-associated neurological illness and its relationship to gluten sensitivity. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2011; 123 (3): 175–80. DOI: 10.1111/j.1600-0404.2010.01356.x.
  25. Gupta S, Tatouli IP, Rosen LB, Hasni S, Alevizos I, Manna ZG, et al. Distinct functions of autoantibodies against interferon in systemic lupus erythematosus: a comprehensive analysis of anticytokine autoantibodies in common rheumatic diseases. *Arthritis & Rheumatology*. 2016; 68 (7): 1677–87. DOI: 10.1002/art.39607.
  26. Savateeva E, Filippova M, Valuev-Elliston V, Nuralieva N, Yukina M, Troshina E, et al. Microarray-based detection of antibodies against SARS-CoV-2 proteins, common respiratory viruses and type I interferons. *Viruses*. 2021; 13: 2553. DOI: 10.3390/v13122553.
  27. Zimmerman RK, Balasubramani GK, Nowalk MP, Eng H, Urbanski L, Jackson M L, et al. Classification and Regression Tree (CART) analysis to predict influenza in primary care patients. *BMC Infectious Diseases*. 2016; 16 (1): 503. DOI: 10.1186/s12879-016-1839-x.
  28. Sarna VK, Lundin KEA, Mørkrid L, Qiao SW, Sollid LM, Christophersen A. HLA-DQ-gluten tetramer blood test accurately identifies patients with and without celiac disease in absence of gluten consumption. *Gastroenterology*. 2018; 154 (4): 886–896. e6. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.11.006.
  29. Elia ZN, Berwary NJA. Effectiveness of a gluten-free diet on the autoantibody frequency of endocrine and neuron disorders in patients with celiac disease. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*. 2024; 7 (1): 34–43. DOI: 10.5455/jabet.2024.d03.
  30. Tiberti C, Montuori M, Trovato CM, Panimolle F, Filardi T, Valitutti F, et al. Gluten-free diet impact on dynamics of pancreatic islet-specific autoimmunity detected at celiac disease diagnosis. *Pediatric Diabetes*. 2020; 21 (5): 774–80. DOI: 10.1111/pedi.13054.

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ФОТОФЕРЕЗА И ГЛАТИРАМЕРА АЦЕТАТА В ЛЕЧЕНИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

А. В. Кильдюшевский, С. В. Котов, О. П. Сидорова , А. В. Бородин, М. С. Бунак

Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского, Москва, Россия

Рассеянный склероз — аутоиммунное заболевание, в развитии которого играет роль гуморальный и клеточный иммунитет. Препараты, изменяющие течение рассеянного склероза (ПИТРС), замедляют прогрессирование болезни, но не все пациенты хорошо переносят назначаемое лечение, возможны аллергические реакции и другие побочные эффекты. В связи с этим актуальна разработка новых методов лечения, включая немедикаментозные. К таким методам относят экстракорпоральный фотоферез, при котором проводится воздействие ультрафиолетовыми лучами на лимфоциты периферической крови, и его модификация — трансиммунизация (с инкубацией лимфоцитов после ультрафиолетового воздействия). Целью работы было сравнить и оценить через год эффективность трансиммунизации и препарата глатирамира ацетата у пациентов с ремиттирующим течением рассеянного склероза. Обследовали 19 взрослых пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом, которым назначали трансиммунизацию. В исследование были включены пациенты старше 18 лет, которым не проводили другие методы лечения (ПИТРС и др.). Группу сравнения составили 48 взрослых пациентов с ремиттирующим течением рассеянного склероза, которым был назначен глатирамира ацетат в дозе 20 мг подкожно ежедневно. Клиническую оценку проводили по шкале EDSS. МРТ головного и спинного мозга осуществляли на аппаратах с напряженностью магнитного поля 3,0 и 1,5 Тл. При проведении трансиммунизации отмечено снижение медианы общего показателя EDSS с 2 до 1,5 баллов. В группе сравнения пациентов, получающих глатирамира ацетат, медиана EDSS изменялась от 1,75 балла до 2 баллов. Следовательно, трансиммунизация сопоставима с ПИТРС первой линии и может быть применена для стабилизации течения заболевания.

**Ключевые слова:** рассеянный склероз, экстракорпоральный фотоферез, трансиммунизация, аутоиммунное заболевание, глатирамира ацетат

**Вклад авторов:** А. В. Кильдюшевский — планирование исследования, анализ литературы, проведение экстракорпорального фотофереза (трансиммунизации), интерпретация данных, написание статьи; С. В. Котов — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, написание статьи; О. П. Сидорова — анализ литературы, сбор и интерпретация данных, обследование пациентов по шкале EDSS, написание статьи; А. В. Бородин — анализ литературы, сбор и интерпретация данных, обследование пациентов по шкале EDSS, написание статьи; М. С. Бунак — анализ литературы, сбор и интерпретация данных, проведение МРТ, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом (протокол № 16 от 26 ноября 2020 г.); все участники подписали добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Петровна Сидорова  
ул. Щепкина, 61/2, г. Москва, 129110, Россия; sidorovaop2019@mail

**Статья получена:** 02.04.2025 **Статья принята к печати:** 19.04.2025 **Опубликована онлайн:** 29.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.023

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## COMPARISON OF EXTRACORPOREAL PHOTOPHERESIS AND GLATIRAMER ACETATE EFFICACY IN THE TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS

Kildyushevsky AV, Kotov SV, Sidorova OP , Borodin AV, Bunak MS

Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

Multiple sclerosis is an autoimmune disorder, the development of which involves humoral and cellular immunity. The disease-modifying drugs (DMDs) for multiple sclerosis slow down the disease progression, but the therapy prescribed is not always well tolerated by patients; allergy and other side effects are possible. In this regard, the development of new methods, including non-pharmacological ones, is relevant. These methods include extracorporeal photopheresis involving UV exposure of peripheral blood lymphocytes and its modification — transimmunization (involving incubation of lymphocytes after UV exposure). The study aimed to compare and within a year assess the transimmunization and glatiramer acetate efficacy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. A total of 19 adult patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, who had been prescribed transimmunization, were assessed. Patients over the age of 18, who did not receive treatment by other methods (DMDs for multiple sclerosis, etc.), were included in the study. The comparison group consisted of 48 adult patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, who were prescribed subcutaneous glatiramer acetate 20 mg daily. Clinical assessment was performed using EDSS. Brain and spinal cord MRI was performed in the 3.0 and 1.5 T scanners. When performing transimmunization, the decrease in the median overall EDSS score from 2 to 1.5 points was reported. In the comparison group of patients receiving glatiramer acetate, the median EDSS score changed from 1.75 to 2 points. Therefore, transimmunization is comparable with first-line DMDs for multiple sclerosis and can be used to stabilize the disease course.

**Keywords:** multiple sclerosis, extracorporeal photopheresis, transimmunization, autoimmune disease, glatiramer acetate

**Author contribution:** Kildyushevsky AV — study planning, literature review, extracorporeal photopheresis (transimmunization), data interpretation, manuscript writing; Kotov SV — study planning, literature review, data interpretation, manuscript writing; Sidorova OP — literature review, data acquisition and interpretation, patient assessment using EDSS, manuscript writing; Borodin AV — literature review, data acquisition and interpretation, patient assessment using EDSS, manuscript writing; Bunak MS — literature review, data acquisition and interpretation, MRI, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee (protocol No. 16 dated 26 November 2020); the informed consent to participation in the study was submitted by all subjects.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga P. Sidorova  
Shhepkina 61/2, Moscow, 129110, Russia; sidorovaop2019@mail

**Received:** 02.04.2025 **Accepted:** 19.04.2025 **Published online:** 29.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.023

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Рассеянный склероз — это аутоиммунное заболевание, в развитии которого играет роль гуморальный и клеточный иммунитет. Применение препаратов, изменяющих течение рассеянного склероза (ПИТРС), сыграло существенную роль в замедлении прогрессирования болезни, повышении продолжительности, улучшении качества жизни больных, предупреждении обострений заболевания. Но не все пациенты хорошо переносят назначаемое лечение, могут возникать аллергические реакции и другие побочные эффекты. В связи с этим актуальна разработка новых методов лечения, включая немедикаментозные. К таким методам относят экстракорпоральный фотоферез (ЭКФФ), при котором проводится воздействие ультрафиолетовыми (УФ) лучами на лимфоциты периферической крови, и его модификация — трансиммунизация (с инкубацией лимфоцитов после ультрафиолетового воздействия). Метод экстракорпорального фотофереза предложил Richard Edelson в Йельском университете в США для лечения Т-клеточной кожной лимфомы в 1987 г. [1]. Методику первоначально применяли для эффективного лечения Т-клеточной лимфомы. Затем показания к ее применению были расширены, ее стали применять для профилактики отторжения трансплантатов, при аутоиммунных заболеваниях [2–13]. Фототерапия УФ-излучением обладает различными свойствами, такими как противовоспалительное, иммуносупрессивное и цитотоксическое. Механизмы ее действия неясны, но включают в себя изменение презентации антигенов, снижение активности естественных киллеров (NK-клеток) и апоптоз Т-лимфоцитов и кератиноцитов. Фотоферез приводит к тому, что дендритные клетки получают антиген от апоптотических лимфоцитов, что вызывает специфический иммунный ответ без системной иммуносупрессии [14]. В мире более 70 000 пациентов получили в общей сложности 3 млн процедур.

Показано положительное влияние экстракорпорального фотофереза на течение экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у животных [15]. Отмечено уменьшение тяжести клинических проявлений заболевания у экспериментальных животных. При гистологическом исследовании на фоне лечения ЭКФФ инфильтраты мононуклеаров в спинном мозге были менее выражены, чем в контрольной группе. Уровень антител к основному белку миелина (АТОБМ) у экспериментальных крыс линии Lewis с энцефаломиелитом, которым проводили ЭКФФ, был ниже, чем у крыс, не получавших лечение ( $p = 0,03$ ). После проведения ЭКФФ у животных с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом значительно снижался уровень провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ). Таким образом, результаты исследования продемонстрировали эффективность ЭКФФ в отношении изменения тяжести и клинического течения ЭАЭ.

В последующем методика ЭКФФ была применена у пациентов с рассеянным склерозом. Было показано, что она может быть эффективной при лечении ремитирующей формы заболевания, но существенно не изменяет течение первично прогрессирующей формы [16–20]. Авторы сообщили о безопасности метода и некоторые предварительные данные об эффективности, полученные с помощью ЭКФФ, при лечении пяти пациентов с ремитирующей формой рассеянного склероза: в большинстве случаев ЭКФФ приводил к снижению частоты рецидивов и стабилизации EDSS, MPT. Авторы подтвердили безопасность и переносимость ЭКФФ и полагают, что эта терапия может быть полезной в качестве

терапевтической альтернативы в подгруппе пациентов с ремитирующим рассеянным склерозом.

Проводится поиск адекватных комбинаций экстракорпорального фотофереза с другими методами экстракорпоральной гемокоррекции и медикаментозной терапии, который может привести к увеличению эффективности лечения аутоиммунных заболеваний [21, 22].

Цель нашей работы — сравнить эффективность трансиммунизации по отношению к препарату глатирамира ацетат при ремитирующем течении рассеянного склероза у пациентов в течение года.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М. Ф. Владимирского» 19 взрослым пациентам с ремитирующим рассеянным склерозом проведено лечение с помощью трансиммунизации (модифицированный метод ЭКФФ). В исследование были включены пациенты старше 18 лет, которым не проводили другие методы лечения (препараты ПИТРС и др.).

Критерии включения пациентов в исследование: диагноз рассеянного склероза, подтвержденный в соответствии с международными критериями MacDonald 2005 года; ремитирующее течение рассеянного склероза; возраст пациентов на момент включения от 18 до 60 лет; отсутствие терапии ПИТРС до назначения ЭКФФ; инвалидизация по шкале EDSS менее 6,0 баллов на момент включения; способность дать письменное информированное согласие.

Критерии исключения пациентов: недостоверный диагноз РС; вторично-прогрессирующее течение или первично-прогрессирующее течение; применение ПИТРС до начала исследования; инвалидизация по шкале EDSS более 6,0 баллов; выраженные когнитивные нарушения.

Группу сравнения составили 48 взрослых пациентов с ремитирующим течением рассеянного склероза, которым был назначен глатирамера ацетат в дозе 20 мг подкожно ежедневно.

Клиническую оценку эффективности лечения осуществляли по данным неврологического статуса пациентов. Использовали Расширенную шкалу инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS). С помощью шкалы EDSS определяют выраженность инвалидизации, которая зависит от способности пациента к передвижению, от степени поражения по шкалам FS. Оценка по шкале EDSS происходит в баллах от 0 (нормальный неврологический статус) до 10 (летальный исход от рассеянного склероза). Шкала Куртцке позволяет оценить тяжесть состояния, степень прогрессирования рассеянного склероза, определить эффективность лечебных мероприятий.

Неврологический статус у пациентов оценивали в начале терапии, затем до каждого курса ЭКФФ и в случае обострения заболевания — до назначения глюкокортикоидной терапии и после нее.

Для МРТ головного и спинного мозга использовали следующие аппараты с напряженностью магнитного поля 3,0 и 1,5 Тл:

1) магнитно-резонансный томограф со сверхпроводящим магнитом «Achieva 3.0 T» с напряженностью магнитного поля 3,0 Тл и шагом сканирования 3–5 мм, регистрационное удостоверение № 2004/708, сертификат соответствия № РОСС NL CH01В 84154 (Philips Medical System Nederland B.V., Нидерланды);

2) магнитно-резонансный томограф со сверхпроводящим магнитом «Optima MR» 450 w Gem с напряженностью магнитного поля 1,5 Тл и шагом сканирования 3–5 мм, регистрационное удостоверение № 95/112; гигиенический сертификат № 7.99.04.944.Д.000967.02.01; сертификат соответствия № РОСС FR ИМ 02.В08001 (General Electric, США).

МРТ проводили для верификации диагноза, до начала проведения ЭКФФ, в динамике каждые 6 месяцев и при подозрении на обострение заболевания.

### Методика ЭКФФ (транссиммунизации)

#### Оборудование

1. Аппарат для цитоплазмафереза MSC+ (Neamoneticcorporation, США).

Регистрационное удостоверение Минздрава России 2005/119/28.09.05.

Выделение мононуклеаров осуществляется по протоколу RBCP (выделение стволовых клеток).

Технические характеристики:

- ширина: 37 см, длина: 57 см;
- высота 44 см (в закрытом виде), 67 см (в рабочем состоянии);

- масса: 28 кг,

- источники питания: 220 Вт, 60 Гц,

- скорость работы насоса: 20–250 мл/мин,

- скорость вращения центрифуги: 3000–7000 об./мин,

- соотношение антикоагулянт/кровь: от 1 : 8 до 1 : 16.

Используемый антикоагулянт: цитрат натрия 2,2%, лимонная кислота (моногидрат) 0,8%, глюкоз(моногидрат) 2,45%, вода для инъекций до 1000 мл.

2. Облучатель крови экстракорпоральный «Юлия» ОКУФКЭ-320/400-600/650-01 (ЗАО НПФ «Метом», Россия).

Регистрационное удостоверение Минздрава России 29/01040502/4362-02/25.09.2002.

Технические характеристики:

- диапазон длин волн: для кварцевой лампы ЛУФТ-6 — 320–400 нм; для лампы ЛК-6 — 600–650 нм;

- величина энергетической освещенности на поверхности кюветы в пределах светового пятна, равного размерам проточной части кюветы, не менее 3 мВт/см<sup>2</sup> от одной лампы;

- работает от сети переменного тока напряжением 220 В;

- потребляемая мощность: не более 50 ВА;

- цикл режима работы: 20 мин (работа), 10 мин (перерыв);

- вес: не более 2 кг.

Габаритные размеры 270 × 160 × 80 мм.

3. Контейнер для крови и ее компонентов полимерный однократного применения ТУ 64-2-361-85. Регистрационный номер 86/1027-12-1.

4. Фотосенсибилизирующий препарат Аммифурин (8-метоксипсорален) («ВИЛАР», Россия).

Регистрационный номер ЛС-002598 от 26.10.2011, таблетки по 20 мг.

#### Порядок проведения экстракорпоральной фотохимиотерапии (транссиммунизации)

За 2 ч до процедуры пациенты принимали внутрь Аммифурин (8-метоксипсорален). На клеточном сепараторе Neamonetics MCS+ (США) по протоколу PBSC проводили выделение мононуклеарных клеток. Далее мононуклеары подвергли УФ-облучению в течение 90 мин и инкубации в течение 20 ч при температуре 37 °С. На следующий день клетки реинфузировали пациенту. Процедуру проводили 2 раза в неделю ежемесячно на протяжении 6 месяцев.

ЭКФФ в начале лечения проводили 1 раз в месяц в течение 6 месяцев. Затем каждый раз увеличивали интервал на месяц. В последующем проводили лечение раз в 6 месяцев. Контрольную МРТ головного мозга с контрастным веществом на основе гадолиния осуществляли раз в 6 месяцев. При клиническом обострении и по данным МРТ-исследования проводили пульс-терапию метилпреднизолоном.

#### Статистический анализ

Статистическую обработку выполняли в среде разработки RStudio 2023.09.0 с помощью языка программирования R версии 4.3.1. В качестве описательных статистик для количественных переменных рассчитывали средние арифметические значения и стандартные отклонения ( $M \pm SD$ ), медианы и квартили ( $Me [LQ; UQ]$ ), минимум и максимум. Для сравнения количественных переменных в двух группах использовали критерий Манна-Уитни или критерий Уилкоксона (для связанных выборок). Для качественных переменных были рассчитаны абсолютные ( $n$ ) и относительные (%) частоты. Сравнение качественных переменных в двух группах проводили с помощью точного критерия Фишера. Уровень статистической значимости ( $\alpha$ ) был принят равным 0,05 (нулевые гипотезы отвергали при  $p < \alpha$ ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В течение одного года на фоне проведения ЭКФФ — транссиммунизации проводили наблюдение 19 пациентов с ремитирующим течением рассеянного склероза. Преобладающее число пациентов находилось в возрастном диапазоне 18–27 лет (42,1%) (табл. 1).

Медиана возраста пациентов составила 30 лет (LQ = 26; UQ = 47), от 20 до 60 лет (табл. 2)

Таблица 1. Распределение пациентов по возрасту

Возраст	18–27 лет	28–37 лет	38–47 лет	48–57 лет	58–67 лет	≥ 68 лет
Кол-во человек ( $n$ )	8	5	3	2	1	–

Таблица 2. Сводная таблица анамнестических данных

Показатели	Медиана (LQ, UQ, минимум, максимум)
Мужчины / женщины	2/17
Возраст начала терапии (лет)	30 [LQ = 26; UQ = 47] 20–60
Возраст дебюта (лет)	23 [LQ = 21; UQ = 30] 11–51
Продолжительность заболевания (лет)	6 [LQ = 2,5; UQ = 10] 1–37

Таблица 3. Клинические проявления дебюта заболевания

Клинические проявления	Абс. (%)
Зрительные нарушения	8 (42,11%)
Чувствительные нарушения	6 (31,58%)
Пирамидные нарушения	2 (10,52%)
Полисимптомный дебют	3 (15,79%)

Большинство пациентов составили женщины (89,5% женщин и 10,5% мужчин). Соотношение мужчины/женщины — 2/17. Медиана возраста начала заболевания — 23 года (LQ = 21; UQ = 30), от 11 до 51 года. Медиана продолжительности болезни составила 6 лет (LQ = 2,5; UQ = 10), от 1 года до 37 лет.

Первым клиническим симптомом болезни в большинстве случаев (42,11%) были зрительные нарушения (табл. 3). На втором месте стояли чувствительные нарушения (31,58%). Дебют заболевания с появления пирамидных нарушений происходил в 10,52% случаев. Полисимптомный дебют — в 15,79%. Полисимптомный дебют включал одновременно нарушение зрения, чувствительные и мозжечковые нарушения, ствольные и пирамидные нарушения, пирамидные и тазовые нарушения.

В табл. 4 представлена степень инвалидизации пациентов рассеянным склерозом по шкале EDSS до начала лечения. Наибольший удельный вес составила легкая степень инвалидизации ( $\leq 2,5$  балла по шкале EDSS). Она была зарегистрирована у 15 пациентов (78,5% случаев). Умеренная степень инвалидизации (3,0–5,5 баллов по шкале EDSS) была определена у четырех пациентов (21,5%). Эти пациенты были способны передвигаться без вспомогательных средств.

Медиана балла EDSS в общей группе пациентов с ремиттирующим течением рассеянного склероза, которым проводили экстракорпоральный фотоферез, составила 2 (LQ = 1,5; UQ = 2,5), от 1 до 5,5 баллов. Через год от начала лечения этот показатель не изменился — 1,5 (LQ = 1; UQ = 2), от 0 до 3,5 баллов. У семи пациентов (36,84%) снизился балл EDSS (см. рис.).

Увеличение балла EDSS в общей группе пациентов по сравнению с предыдущим значением, таким образом, отмечалось в 5,26% случаев. У пяти пациентов в течение года от начала лечения на МРТ были выявлены очаги в белом веществе с накоплением контрастного вещества.

В группе сравнения пациентов с ремиттирующим течением рассеянного склероза, проходивших лечение глатирамером ацетатом, медиана EDSS составила 1,75 баллов (LQ = 1,5; UQ = 2,5), от 1 до 5 баллов. Отличие данной группы пациентов от группы пациентов, получавших трансиммунизацию, статистически не значимо ( $p = 0,748$ ). Медиана EDSS через год составила 2 балла (LQ = 1,5; UQ = 3), от 1 до 5 баллов. В течение года от начала лечения увеличение балла EDSS отмечалось в 29,27% случаев. Медиана EDSS через год лечения экстракорпоральным фотоферезом — трансиммунизацией не показывает

негативные результаты по сравнению с применением ПИТРС первой линии глатирамером ацетатом (рис. 1).

### Клинический случай

Пациентка, 40 лет, жаловалась на нарушение походки, периодическое недержание мочи. Заболела в возрасте 29 лет, появились слабость в левых конечностях, нарушение речи. На МРТ головного мозга были выявлены множественные очаги демиелинизации. Офтальмолог диагностировал частичную атрофию зрительных нервов. В неврологическом статусе по шкале EDSS зарегистрировано 5,5 баллов. После одной процедуры ЭКФФ показатель EDSS снизился до 5 баллов, после четырех процедур — до 4,5 балла, после пяти он составил 2,5 балла. В последующем было обострение, и показатель EDSS повысился до 3,5 баллов, но не ухудшился до значения перед началом лечения. Таким образом, при высоком балле EDSS и длительном течении заболевания (11 лет) были получены хорошие результаты.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представлены данные о применении методики экстракорпоральной фотохимиотерапии в ее модификации (с инкубацией лимфоцитов крови) у пациентов с ремиттирующим рассеянным склерозом. Метод в течение длительного времени широко зарекомендовал себя при различных патологиях, связанных с аутоиммунными проявлениями (реакция «трансплантат против хозяина», аутоиммунные проявления при коронавирусной инфекции, болезнь Крона и др.) [23]. Ряд авторов применяли метод ЭКФФ без инкубации лимфоцитов в сочетании с плазмаферезом у 40 пациентов с рассеянным склерозом [24–26]. При уровне антител к основному белку миелина свыше 500 мкг/л и более плазму удаляли и лимфоциты подвергали УФ-облучению. При концентрации антител к основному белку миелина менее 500 мкг/л выделенную плазму со взвесью лимфоцитов подвергали облучению и затем реинфузировали. У 36 пациентов (90%) получен хороший и удовлетворительный лечебный эффект, оцениваемый по степени регресса неврологического дефицита по шкале EDSS (хороший эффект — 2 балла, удовлетворительный — 1 балл). У четырех пациентов эффект расценили как незначительный. Ни в одном случае не отмечено ухудшения состояния пациентов или каких-либо побочных действий. Катамнестическое наблюдение в

Таблица 4. Выраженность инвалидизации по шкале EDSS до начала лечения

EDSS	I группа
От 0 до 2,5 баллов (легкая степень инвалидизации)	78,95% (15)
От 3,0 до 5,5 баллов (средняя степень инвалидизации)	21,05% (4)
От 6,0 баллов (тяжелая степень инвалидизации)	–
Медиана балла EDSS	1,5 [LQ = 1,5; UQ = 2,5] 1–5,5

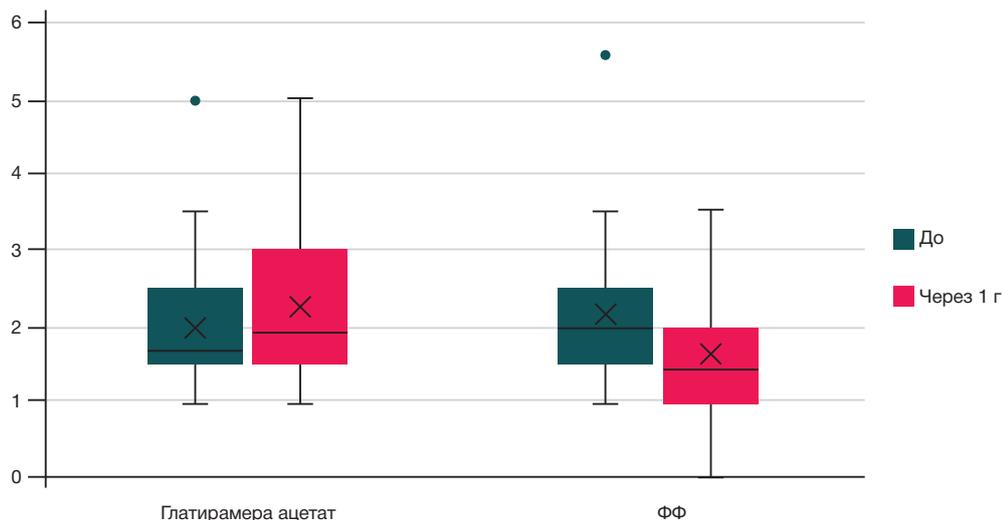


Рис. Динамика показателя EDSS у пациентов с рассеянным склерозом после лечения экстракорпоральным фотоферезом (ФФ) и глатирамера ацетатом

течение года не выявило прогрессирования заболевания. Было отмечено улучшение в виде уменьшения на 1–2 балла по шкале EDSS. Титр антител к основному белку миелина снижался в 2 раза по сравнению с исходными данными. Наблюдали снижение количества натуральных киллеров CD16 и T-хелперов CD4, митоген-индуцированной продукции  $\gamma$ -ИФН. При осмотрах пациентов в динамике обострения заболевания не отмечено до 6 месяцев катamnестического наблюдения.

В данном исследовании мы сравнили эффективность ЭКФФ с модификацией (транссиммунизацией) и препарата глатирамира ацетата у пациентов с ремитирующим течением рассеянного склероза в течение одного года наблюдения. Результаты нашего исследования показывают, что транссиммунизация может быть сопоставима с традиционными методами лечения, например глатирамера ацетатом, что показывает возможность новых подходов к терапии данного заболевания.

Рассеянный склероз является сложным аутоиммунным заболеванием, и его лечение требует индивидуализированного подхода. Применение ЭКФФ, основанного на воздействии УФ-излучения на лимфоциты, показало свою эффективность в снижении медианы показателя EDSS у пациентов, получающих транссиммунизацию, с 2 до 1,5 баллов. Это снижение указывает на улучшение неврологического статуса и стабильность состояния у значительной части пациентов, что является важным аспектом в лечении рассеянного склероза.

Сравнение с группой пациентов, принимающих глатирамера ацетат, показало, что медиана EDSS в этой группе осталась практически неизменной, увеличившись с 1,75 до 2 баллов. Это свидетельствует о том, что транссиммунизация может быть не только эффективной, но и более предпочтительной для пациентов, которые не переносят традиционные методы лечения или испытывают побочные эффекты.

Важно отметить, что ЭКФФ и его модификации, такие как транссиммунизация, не вызывают аллергических реакций и формирования аутоантител, что делает их безопасной альтернативой для пациентов, у которых имеются противопоказания к применению медикаментозных препаратов. Это особенно актуально в свете растущей необходимости в разработке новых методов лечения, учитывающих индивидуальные особенности пациентов. Необходимо однако учитывать,

что в нашем исследовании наблюдалось увеличение балла EDSS у некоторых пациентов, что подчеркивает важность постоянного мониторинга состояния пациентов и возможного применения пульс-терапии для быстрого контроля обострений. В дальнейших исследованиях важно сосредоточить внимание на более длительном наблюдении за пациентами и оценке долгосрочных эффектов транссиммунизации, а также на изучении ее комбинирования с другими методами лечения.

Результаты нашего исследования подтверждают возможность применения транссиммунизации как эффективного метода лечения ремитирующего рассеянного склероза.

## ВЫВОДЫ

Представлены результаты наблюдения в течение года за пациентами с ремитирующим течением рассеянного склероза, находящимися на немедикаментозном лечении с помощью транссиммунизации — модифицированного метода ЭКФФ. До шести месяцев процедуру назначали ежемесячно, затем интервал увеличивали каждый раз на месяц и в последующем транссиммунизацию проводили раз в шесть месяцев. До начала лечения у пациентов была легкая и средняя степень инвалидизации по шкале EDSS. При наблюдении в течение года отмечено снижение медианы общего показателя EDSS с 2 баллов до 1,5 баллов. В одном случае после улучшения клинического состояния пациентки в течение шести месяцев проведения транссиммунизации в последующем отметилось увеличение балла EDSS, но оно не достигло показателя, который регистрировали до начала лечения. В группе сравнения пациентов, принимающих глатирамера ацетат, также были случаи увеличения балла EDSS по сравнению с исходным показателем, требующие проведения пульс-терапии метилпреднизолоном. Не выявлено отрицательного влияния транссиммунизации на течение рассеянного склероза в течение года наблюдения за больными. Таким образом, применение транссиммунизации крови сопоставимо с применением ПИТРС первой линии, не вызывает аллергических реакций и привыкания (образования аутоантител к белковому препарату) и может быть рекомендовано как стартовая терапия, так и терапия после неудачного применения ПИТРС первой линии из-за их побочных эффектов. Так как

полностью невозможно изменить иммунный статус пациентов, при ЭКФФ, как и при других методах лечения рассеянного склероза, возможны обострения заболевания и применение пульс-терапии для быстрого подавления активного аутоиммунного процесса, сопровождающегося воспалительными изменениями в центральной нервной системе. Для оценки влияния ЭКФФ на течение рассеянного склероза возможно наблюдение за этими пациентами на фоне лечения в

течение более длительного времени. Данная методика может быть использована в клинической практике у пациентов с рассеянным склерозом в качестве одного из методов лечения, относящегося к первой линии, для профилактики прогрессирования заболевания. Будущие исследования могут быть направлены на изучение механизма действия трансиммунизации на клеточном уровне и оценку ее эффективности в сочетании с другими немедикаментозными методами лечения.

## Литература

- Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, Wintroub B, et al. New therapies for cutaneous T-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1987; 316 (6): 297–303. DOI: 10.1056/NEJM198702053160603.
- Michallet M, Sobh M, Deloire A, Revesz D, Chelgoum Y, El-Hamri M. Second line extracorporeal photopheresis for cortico-resistant acute and chronic GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies: Long-term results from a real-life study. *Transfus Apher Sci*. 2024; 63 (3): 103899. DOI: 10.1016/j.transci.2024.103899.
- Rastogi S, Kim EJ, Gelfand JM, Loren AW, Baumrin E. Chronic Graft-versus-Host Disease-Associated Muscle Cramps: Severity and Response to Immunomodulatory Therapies. *Transplant Cell Ther*. 2024; 30(3): 338.e1–338.e6. DOI: 10.1016/j.jtct.2023.12.674.
- Kim D, Taparia M, Robinson E, Mcgee M, Merali T. Navigating the Complexity of Chronic Graft-vs-Host Disease: Canadian Insights into Real-World Treatment Sequencing. *Transplant Proc*. 2024; 56 (2): 409–15. DOI: 10.1016/j.transproceed.2023.12.021.
- Ruf T, Rahimi F, Anz D, Tufman A, Salzer S, Zierold S, et al. Extracorporeal Photopheresis as a Treatment Option for Immune-Related Adverse Events: Two Case Reports and a Prospective Study. *J Immunother*. 2024. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000510.
- Lin Y, Cheng Z, Zhong Y, Zhao Y, Xiang G, Li L, et al. Extracorporeal photopheresis reduces inflammation and joint damage in a rheumatoid arthritis murine model. *J Transl Med*. 2024; 22 (1): 305. DOI: 10.1186/s12967-024-05105-x.
- Fisher AJ, White M, Goudie N, Kershaw A, Phillipson J, Bardgett M, et al. Extracorporeal photopheresis (ECP) in the treatment of chronic lung allograft dysfunction (CLAD): a prospective, multicentre, open-label, randomised controlled trial studying the addition of ECP to standard care in the treatment of bilateral lung transplant patients with CLAD (E-CLAD UK). *BMJ Open Respir Res*. 2024; 11 (1): e001995. DOI: 10.1136/bmjresp-2023-001995.
- Lionet A, Van Triempon M, Figeac M, Fages V, Gibier JB, Provot F, et al. Extracorporeal Photopheresis Reduces Fibrotic and Inflammatory Transcriptomic Biological Marker of Chronic Antibody-mediated Kidney Rejection. *Transplant Direct*. 2024; 10 (3): e1587. DOI: 10.1097/TXD.0000000000001587.
- Mitsunaga K, Bagot M, Ram-Wolff C, Guenova E, von Gugelberg C, Hodak E, et al. Real-world study on the use of pegylated interferon alpha-2a for treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome using Time to Next Treatment as a measure of clinical benefit. An EORTC CLTG study. *Br J Dermatol*. 2024; 152. DOI: 10.1093/bjd/ljae152.
- Castillo-Aleman YM, Krystkowiak PC. Extracorporeal photopheresis in stiff person syndrome. *Front Immunol*. 2024; 15: 1519032. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1519032. eCollection 2024.
- Szabó BG, Reményi P, Tasnády S, Korózs D, Gopcsa L, Réti M, et al. Extracorporeal Photopheresis as a Possible Therapeutic Approach for Adults with Severe and Critical COVID-19 Non-Responsive to Standard Treatment: A Pilot Investigational Study. *J Clin Med*. 2023; 12 (15): 5000. DOI: 10.3390/jcm12155000.
- Кильдюшевский А. В., Молочков А. В., Журавлев О. Р., Митина Т. А., Белоусов К. А., Захаров С. Г., и др. Экстракорпоральный фотоферез в лечении нового коронавирусного заболевания COVID-19 (серия клинических наблюдений). *Альманах клинической медицины*. 2020; 48 (Спецвыпуск 1): 11–19. DOI: 10.18786/2072-0505-2020-48-039.
- Неретин В. Я., Кильдюшевский А. В., Агафонов Б. В., Гехт Б. М., Сидорова О. П., Оспенникова Т. П. Фотоферез — новый метод лечения миастении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2002; 103 (6): 11–14. PMID: 12872619.
- Rathod DG, Muneer H, Masood S. *Phototherapy In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. PMID: 33085287.*
- Lolli F, Liuzzi GM, Vergelli M, Massaccesi L, Ballerini C, Amaducci L, et al. Antibodies specific for the lipid-bound form of myelin basic protein during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1993; 44: 69–75. DOI: 10.1016/0165-5728(93)90269-5.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Lolli F, et al. Extracorporeal photochemotherapy reduces the incidence of relapses in experimental allergic encephalomyelitis in DA rats. *J Neurol*. 2001; 248 (6): 535–6. DOI: 10.1007/s004150170169.
- Cavaletti G, Perseghin P, Buscemi F, Dassi M, Oggioni N, Sala F, et al. Immunomodulating effects of extracorporeal photochemotherapy (ECP) in rats experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Int J Tissue React*. 2001; 23 (1): 21–31. PMID: 11392060.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Braga M, et al. Extracorporeal photochemotherapy reduces the severity of Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis through a modulation of the function of peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004; 18 (1): 9–17. PMID: 15323355.
- Cavaletti G, Perdeghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Braga M, et al. Extracorporeal photochemotherapy reduces the severity of Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis through a modulation of the function of peripheral blood mononuclear cells. *J Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2004; 18 (1): 9–17. PMID: 15323355.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Cavarretta R, Frigo M, Caputo D, et al. Extracorporeal photochemotherapy: a safety and tolerability pilot study with preliminary efficacy results in refractory relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2006; 27 (1): 24–32. PubMed PMID: 16688596.
- Extracorporeal photopheresis: Medical Coverage Guidelines of the Blue Cross and Blue Shield Association of Arizona. 2012; 5 p.
- Ninosu N, Melchers S, Kappenstein M, Booken N, Hansen I, Blanchard M, et al. Mogamulizumab Combined with Extracorporeal Photopheresis as a Novel Therapy in Erythrodermic Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2023; 27–16 (1): 141. DOI: 10.3390/cancers16010141.
- Неретин В. Я., Кильдюшевский А. В., Озерова И. В., Котов С. В., Голенков А. К. Способ лечения пациентов аутоиммунными заболеваниями. Российский патент 2000 г. по МПК А61М1/38 А61Н5/06 2000-11-27. Публикация 1999-01-29.
- Неретин В. Я., Котов С. В., Кильдюшевский А. В., Сидорова О. П., Озерова И. В. Экстракорпоральная фотохимиотерапия в лечении больных рассеянным склерозом. Учебное пособие. М.: МОНИКИ, 2003; 11 с.
- Озерова И. В., Котов С. В., Неретин В. Я., Кильдюшевский А. В. Экстракорпоральная фотохимиотерапия в лечении больных рассеянным склерозом. В сборнике: *Материалы к Республиканскому рабочему совещанию «Вопросы диагностики и лечения демиелинизирующих заболеваний нервной системы»*; 23–24 февраля 1999. Ступино; с. 180–182.

## References

- Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegasothy B, Heald P, Wintroub B, et al. New therapies for cutaneous T-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1987; 316 (6): 297–303. DOI: 10.1056/NEJM198702053160603.
- Michallet M, Sobh M, Deloire A, Revesz D, Chelgoum Y, El-Hamri M. Second line extracorporeal photopheresis for cortico-resistant acute and chronic GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological malignancies: Long-term results from a real-life study. *Transfus Apher Sci*. 2024; 63 (3): 103899. DOI: 10.1016/j.transci.2024.103899.
- Rastogi S, Kim EJ, Gelfand JM, Loren AW, Baumrin E. Chronic Graft-versus-Host Disease-Associated Muscle Cramps: Severity and Response to Immunomodulatory Therapies. *Transplant Cell Ther*. 2024; 30 (3): 338.e1–338.e6. DOI: 10.1016/j.jctc.2023.12.674.
- Kim D, Taparia M, Robinson E, Mcgee M, Merali T. Navigating the Complexity of Chronic Graft-vs-Host Disease: Canadian Insights into Real-World Treatment Sequencing. *Transplant Proc*. 2024; 56 (2): 409–15. DOI: 10.1016/j.transproceed.2023.12.021.
- Ruf T, Rahimi F, Anz D, Tufman A, Salzer S, Zierold S, et al. Extracorporeal Photopheresis as a Treatment Option for Immune-Related Adverse Events: Two Case Reports and a Prospective Study. *J Immunother*. 2024. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000510.
- Lin Y, Cheng Z, Zhong Y, Zhao Y, Xiang G, Li L, et al. Extracorporeal photopheresis reduces inflammation and joint damage in a rheumatoid arthritis murine model. *J Transl Med*. 2024; 22 (1): 305. DOI: 10.1186/s12967-024-05105-x.
- Fisher AJ, White M, Goudie N, Kershaw A, Phillipson J, Bardgett M, et al. Extracorporeal photopheresis (ECP) in the treatment of chronic lung allograft dysfunction (CLAD): a prospective, multicentre, open-label, randomised controlled trial studying the addition of ECP to standard care in the treatment of bilateral lung transplant patients with CLAD (E-CLAD UK). *BMJ Open Respir Res*. 2024; 11 (1): e001995. DOI: 10.1136/bmjresp-2023-001995.
- Lionet A, Van Triempon M, Figeac M, Fages V, Gibier JB, Provot F, et al. Extracorporeal Photopheresis Reduces Fibrotic and Inflammatory Transcriptomic Biological Marker of Chronic Antibody-mediated Kidney Rejection. *Transplant Direct*. 2024; 10 (3): e1587. DOI: 10.1097/TXD.0000000000001587.
- Mitsunaga K, Bagot M, Ram-Wolff C, Guenova E, von Guggenberg C, Hodak E, et al. Real-world study on the use of pegylated interferon alpha-2a for treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome using Time to Next Treatment as a measure of clinical benefit: An EORTC CLTG study. *Br J Dermatol*. 2024; 152. DOI: 10.1093/bjd/ljae152.
- Castillo-Aleman YM, Krystkowiak PC. Extracorporeal photopheresis in stiff person syndrome. *Front Immunol*. 2024; 15: 1519032. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1519032. eCollection 2024.
- Szabó BG, Reményi P, Tasnády S, Korózs D, Gopcsa L, Réti M, et al. Extracorporeal Photopheresis as a Possible Therapeutic Approach for Adults with Severe and Critical COVID-19 Non-Responsive to Standard Treatment: A Pilot Investigational Study. *J Clin Med*. 2023; 12 (15): 5000. DOI: 10.3390/jcm12155000.
- Kildyushevsky AV, Molochkov AV, Zhuravlev OR, Mitina TA, Belousov KA, Zakharov SG, et al. Jekstrakorporal'nyj fotoferez v lechenii novogo koronavirusnogo zabojevanija COVID-19 (serija klinicheskikh nabljudenij). *Al'manah klinicheskoy medicinyju*. 2020; 48 (Specvypusk 1): 11–19. DOI: 10.18786/2072-0505-2020-48-039. Russian.
- Neretin V Ya, Kildyushevsky AV, Agafonov BV, Geht BM, Sidorova OP, Ospennikova TP. Fotoferez — novyj metod lechenija miastenii. *Zhurnal nevrologii i psihiatrii im. S. S. Korsakova*. 2002; 103 (6): 11–14. PMID: 12872619. Russian.
- Rathod DG, Muneer H, Masood S. Phototherapy In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. PMID: 33085287.
- Lolli F, Liuzzi GM, Vergelli M, Massacesi L, Ballerini C, Amaducci L, et al. Antibodies specific for the lipid-bound form of myelin basic protein during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1993; 44: 69–75. DOI: 10.1016/0165-5728(93)90269-5.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Lolli F, et al. Extracorporeal photochemotherapy reduces the incidence of relapses in experimental allergic encephalomyelitis in DA rats. *J Neurol*. 2001; 248 (6): 535–6. DOI: 10.1007/s004150170169.
- Cavaletti G, Perseghin P, Buscemi F, Dassi M, Oggioni N, Sala F, et al. Immunomodulating effects of extracorporeal photochemotherapy (ECP) in rats experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *Int J Tissue React*. 2001; 23 (1): 21–31. PMID: 11392060.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Braga M, et al. Extracorporeal photochemotherapy reduces the severity of Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis through a modulation of the function of peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004; 18 (1): 9–17. PMID: 15323355.
- Cavaletti G, Perdeghin P, Dassi M, Oggioni N, Sala F, Braga M, et al. Extracorporeal photochemotherapy reduces the severity of Lewis rat experimental allergic encephalomyelitis through a modulation of the function of peripheral blood mononuclear cells. *J Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2004; 18 (1): 9–17. PMID: 15323355.
- Cavaletti G, Perseghin P, Dassi M, Cavarretta R, Frigo M, Caputo D, et al. Extracorporeal photochemotherapy: a safety and tolerability pilot study with preliminary efficacy results in refractory relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2006; 27 (1): 24–32. PubMed PMID: 16688596.
- Extracorporeal photopheresis: Medical Coverage Guidelines of the Blue Cross and Blue Shield Association of Arizona. 2012; 5 p.
- Ninosu N, Melchers S, Kappenstein M, Booken N, Hansen I, Blanchard M, et al. Mogamulizumab Combined with Extracorporeal Photopheresis as a Novel Therapy in Erythrodermic Cutaneous T-cell Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2023; 27–16 (1): 141. DOI: 10.3390/cancers16010141.
- Neretin VYa, Kildyushevsky AV, Ozerova IV, Kotov SV, Golenkov AK. Method of treatment of patients with autoimmune diseases. The 2000 Russian patent on IPC A61M1/38 A61N5/06 2000-11-27. Publication 1999-01-29. Russian.
- Neretin VYa, Kotov SV, Kildyushevsky AV, Sidorova OP, Ozerova IV. Jekstrakorporal'naja fotohimioterapija v lechenii bol'nyh rassejannym sklerozom. *Uchebnoe posobie*. M.: MONIKI, 2003; 11 s. Russian.
- Ozerova IV, Kotov SV, Neretin VYa, Kildyushevsky AV. Jekstrakorporal'naja fotohimioterapija v lechenii bol'nyh rassejannym sklerozom. V sbornike: *Materialy k Respublikanskomu rabochemu soveshhaniju «Voprosy diagnostiki i lechenija demielinizirujushhij zabojevanij nervnoj sistemy»*; 23–24 fevralja 1999. Stupino; s. 180–182. Russian.

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУБХОНДРАЛЬНОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТЕОАРТРОЗЕ КОЛЕННОГО СУСТАВА

Б. Ш. Минасов<sup>1</sup>, Р. Р. Якупов<sup>1</sup>, В. Н. Акбашев<sup>1</sup>✉, В. С. Щекин<sup>1</sup>, А. О. Власова<sup>1</sup>, Т. Б. Минасов<sup>1</sup>, К. К. Каримов<sup>2</sup>, А. А. Ахмельдинова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

<sup>2</sup> Таджикский государственный медицинский университет имени Абуали ибни Сино, Душанбе, Таджикистан

Морфологические изменения субхондральной костной ткани при остеоартрозе коленного сустава являются ключевым звеном патогенеза и могут предшествовать разрушению суставного хряща. Целью исследования было выявить характерные морфологические и морфометрические признаки остеосклероза и остеопороза в субхондральной зоне бедренной и большеберцовой костей. Выполняли анализ 40 участков костной ткани, полученных при эндопротезировании коленного сустава у 20 пациентов (12 женщин и 8 мужчин) в возрасте 58–75 лет с остеоартрозом III–IV стадий. При гистологической и морфометрической оценке с использованием световой микроскопии и расчетом индекса микрофрактуринга (MFI) установлены достоверные различия в толщине трабекул, интертрабекулярном расстоянии и степени микроповреждений между участками склероза и остеопороза. Повышенные значения MFI в зонах остеопороза могут отражать снижение прочности субхондральной кости. Полученные данные подтверждают диагностическую значимость морфометрической оценки субхондральной зоны и перспективность применения MFI как количественного критерия риска при планировании ортопедического лечения.

**Ключевые слова:** остеоартроз, субхондральная, кость, остеосклероз, остеопороз, морфометрия, микротрещины, индекс микрофрактуринга

**Вклад авторов:** Б. Ш. Минасов — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование текста; Р. Р. Якупов — сбор материала, морфологическое исследование, первичная обработка данных; В. Н. Акбашев — статистическая обработка, визуализация результатов, написание рукописи; В. С. Щекин — анализ литературы, интерпретация морфологических данных; А. О. Власова — подготовка иллюстраций, морфометрический анализ, редактирование текста; Т. Б. Минасов — оформление и подготовка иллюстраций, обсуждение; К. К. Каримов — сбор материала, клиническое наблюдение пациентов; А. А. Ахмельдинова — составление критериев включения/исключения, координация этического одобрения.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 3 от 12 марта 2025 г.), проведено с соблюдением Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (в редакции 2013 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Владислав Николаевич Акбашев  
ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Россия; vlad-akb@mail.ru

**Статья получена:** 06.04.2025 **Статья принята к печати:** 20.04.2025 **Опубликована онлайн:** 30.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.024

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## MORPHOLOGICAL SUBCHONDRAL BONE TISSUE CHARACTERISTICS IN KNEE OSTEOARTHRITIS

Minasov BSh<sup>1</sup>, Yakupov RR<sup>1</sup>, Akbashev VN<sup>1</sup>✉, Shchekin VS<sup>1</sup>, Vlasova AO<sup>1</sup>, Minasov TB<sup>1</sup>, Karimov KK<sup>2</sup>, Akhmeldinova AA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

<sup>2</sup> Avicenna Tajik State Medical University, Dushanbe, Tajikistan

Morphological subchondral bone tissue alterations associated with knee osteoarthritis represent a key pathogenesis link and can precede articular cartilage destruction. The study aimed to identify typical morphological and morphometric signs of osteosclerosis and osteoporosis in the subchondral zone of the femur and tibia. Analysis of 40 bone tissue fragments collected when performing knee replacement surgery in 20 patients (12 females and 8 males) aged 58–75 years with stage III–IV osteoarthritis was performed. Histological and morphometric assessment involving the use of light microscopy and microfracture index (MFI) calculation revealed significant differences in trabecular thickness, intertrabecular distance, and the degree of microdamage between the sites of sclerosis and osteoporosis. High MFI values in the zones of osteoporosis can reflect reduced subchondral bone strength. The findings confirm the diagnostic value of the subchondral zone morphometry and the prospects of using MFI as a quantitative risk criterion when planning orthopedic treatment.

**Keywords:** osteoarthritis, subchondral bone, osteosclerosis, osteoporosis, morphometry, microcracks, microfracture index

**Author contribution:** Minasov BSh — study concept and design, data analysis and interpretation, manuscript editing; Yakupov RR — material collection, morphological assessment, primary data processing; Akbashev VN — statistical processing, visualization of results, manuscript writing; Shchekin VS — literature review, morphology data interpretation; Vlasova AO — preparing illustrations, morphometry analysis, manuscript proofreading; Minasov TB — preparing illustrations, discussion; Karimov KK — material collection, clinical follow-up of patients; Akhmeldinova AA — drawing up inclusion/exclusion criteria, coordination of ethical approval.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Bashkir State Medical University (protocol No. 3 dated 12 March 2025) and conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki (2013 revision). All patients submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladislav N. Akbashev  
Lenina, 3, Ufa, 450008, Russia; vlad-akb@mail.ru

**Received:** 06.04.2025 **Accepted:** 20.04.2025 **Published online:** 30.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.024

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Остеоартрит (ОА) — одно из наиболее распространенных и социально значимых заболеваний опорно-двигательного аппарата, представляющее собой прогрессирующее, мультифакторное поражение соединительной ткани, ведущее к нарушению кинематического баланса скелета. Он сопровождается острой и хронической болью, ограничением подвижности и высокой вероятностью инвалидизации, особенно среди лиц пожилого возраста. Согласно данным ВОЗ, от симптоматического ОА страдают более 240 млн человек, и эта цифра продолжает неуклонно расти с увеличением продолжительности жизни [1, 2]. Современное представление о патогенезе ОА выходит за рамки локального поражения суставного хряща. Сегодня это заболевание рассматривают как системное нарушение биомеханики и метаболизма соединительной ткани, при котором страдают все компоненты сустава: хрящ, субхондральная кость, синовиальная оболочка, связки, капсула и околоуставные мышцы [3, 4]. Центральным элементом становится дисбаланс между адаптационными и деструктивными процессами, возникающий под действием перегрузки, воспаления и нарушений тканевого гомеостаза [5]. В последние годы особое внимание уделяют субхондральной кости как ключевому звену патогенеза ОА. Выявлено, что нарушения ее структуры — в том числе остеосклероз, остеопороз, субхондральные микротрещины и ремоделирование трабекул — могут предшествовать дегенерации хряща и существенно влиять на прогрессирование заболевания [6–8]. Эти изменения рассматривают как следствие хронической перегрузки и нарушений механотрансдукции в условиях нестабильного биомеханического равновесия.

Одним из ключевых звеньев патогенеза ОА является структурная несостоятельность субхондральной кости, которая выполняет роль не только биомеханической опоры хряща, но и регулятора обменных процессов [9]. Постадийное развитие заболевания клинически проявляется комплексом склеротических, остеопоротических и остеолитических процессов. Их одновременное присутствие формирует гетерогенную морфологическую картину, отражающую столкновение компенсаторных и деструктивных изменений. Эти трансформации не ограничиваются анатомией: они связаны с нарушением кинематических связей, изменением вектора силовых нагрузок и, как следствие, клинической манифестацией боли и дисфункции [10].

Биомеханический аспект ОА приобретает ключевое значение в связи с галопирующим развитием синдрома гиперпрессии. Сустав функционирует как единая система, поддерживающая кинематический баланс благодаря жидкокристаллической организации соединительной ткани [11]. Нарушение этого равновесия ведет к перегрузке отдельных компонентов и запускает каскад деструктивно-дистрофических реакций. Меняющаяся картина внутритканевого напряжения угнетает роль клеточ механостатов. Дисбаланс жидкокристаллической организации приводит к гибели механоцитов.

Визуализация и количественная оценка этих процессов стали возможны благодаря современным гистологическим и морфометрическим методам. Анализ тонких срезов субхондральной кости с применением цифровых технологий позволяет выявлять изменения на микроуровне, включая перестройку трабекулярной архитектуры, субхондральный склероз, остеофитоз и остеолит. Эти данные позволяют не только уточнить диагноз, но и оценить стадию заболевания, спрогнозировать его течение и адаптационные ресурсы макроорганизма [12].

В связи с этим возрастает значение интегративного, многофакторного подхода, сочетающего биомеханику, морфологию и клиническую оценку. Только в рамках такой модели можно понять истинную природу ОА — не как локальной болезни сустава, а как системной дисфункции соединительной ткани в условиях нестабильного динамического равновесия.

Цель исследования — оценить морфологические и морфометрические особенности субхондральной костной ткани у пациентов с ОА коленного сустава III–IV стадий, выявить различия между участками остеосклероза и остеопороза, а также обосновать индекс микрофрактуринга (Microfracturing Index, MFI) как количественный критерий структурной прочности субхондральной зоны.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в Морфологической лаборатории Института фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

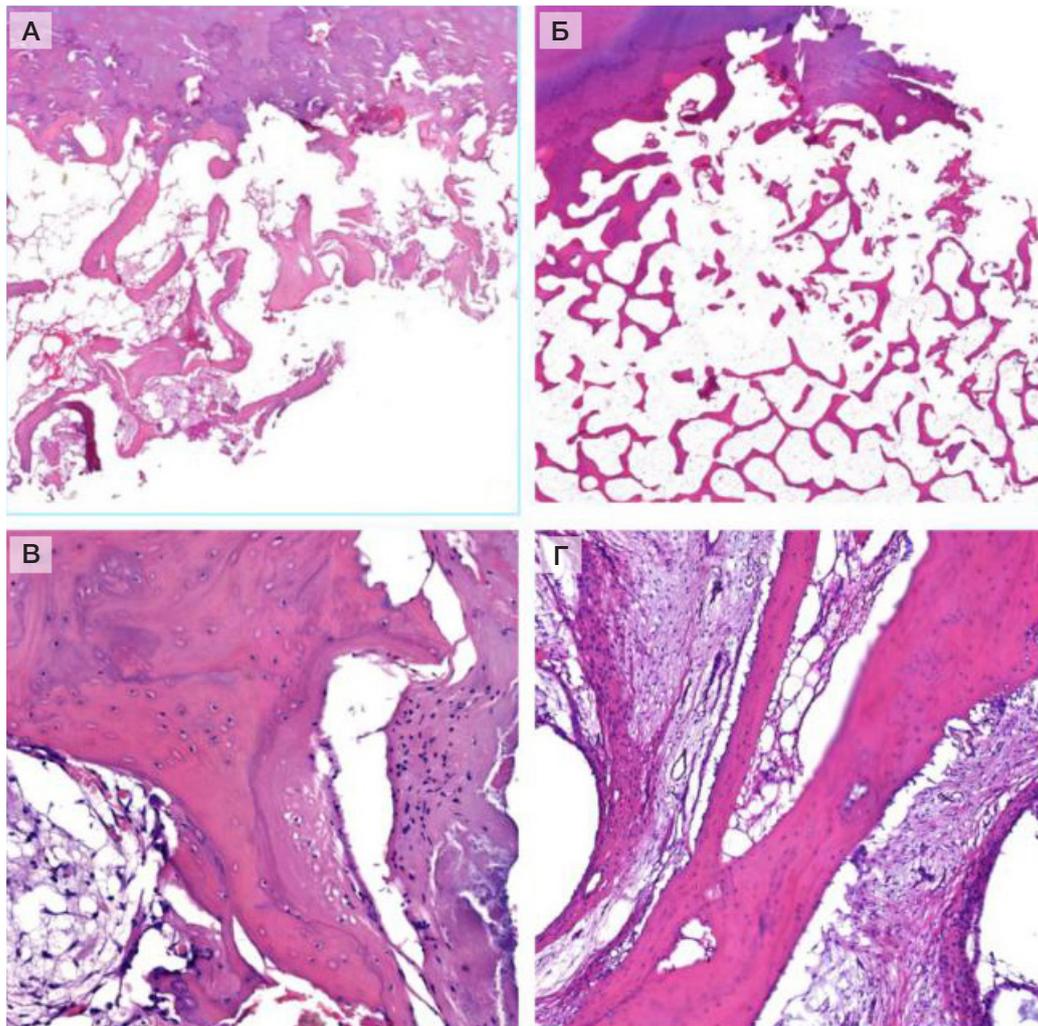
Критерии включения: возраст пациентов старше 55 лет; клинически и рентгенологически подтвержденный первичный (идиопатический) остеоартроз III–IV стадий по классификации Kellgren–Lawrence с длительностью не менее 5 лет; выполнение тотального эндопротезирования коленного сустава; наличие информированного добровольного согласия.

Критерии исключения: наличие ревматических заболеваний; системных метаболических нарушений (включая остеопороз, подтвержденный денситометрически); наличие злокачественных новообразований; перенесенные хирургические вмешательства на том же суставе ранее; хронические заболевания в стадии декомпенсации; наличие инфекции в области оперированного сустава; длительный прием стероидных гормонов; отказ от участия в исследовании.

## Материал исследования

Всего в исследование было включено 20 пациентов (12 женщин и 8 мужчин) в возрасте 58–75 лет (средний возраст —  $66,4 \pm 5,2$  года), которым проводили плановое одностороннее тотальное эндопротезирование коленного сустава по поводу остеоартроза III–IV стадий по классификации Kellgren–Lawrence. Забор операционного материала осуществляли по стандартной методике в однотипных точках, определяемых приоритетным вектором силового напряжения и вне его (внутренние и наружные мыщелки бедра и голени). Размер образцов составлял  $10 \times 15$  мм. У всех пациентов были выделены участки субхондральной костной ткани, характеризующиеся признаками уплотнения (остеосклероза) или разрежения (остеопороза). В ряде случаев оба типа изменений наблюдались в пределах одного образца, что позволило провести внутриобъектное сравнение.

Всего было проанализировано 40 участков костной ткани: 20 с признаками остеосклероза и 20 — с признаками остеопороза. Несмотря на возможность получения до 80 участков (по 4 зоны с каждого пациента), для морфометрического анализа были отобраны 40 наиболее информативных — по два участка на пациента: один с признаками остеосклероза, другой — с остеопорозом. Это обеспечило внутриобъектное сопоставление разнотипных изменений, повышающее точность сравнительного анализа.



**Рис. 1.** Морфологические изменения в уплотненных участках субхондральной костной ткани при остеоартрозе. Гистологическое окрашивание гематоксилином и эозином; увеличение  $\times 20$  (А, Б),  $\times 200$  (В, Г). А. Фрагмент субхондральной зоны бедренной кости: утолщенные трабекулы, анастомозирующая трабекулярная структура, суженные интертрабекулярные пространства. Б. Участок большеберцовой кости: массивные остеоэсклеротические трабекулы, хаотичное расположение, уменьшение количества гаверсовых каналов, частичное замещение интертрабекулярного пространства фиброзной тканью. В. Паратрабекулярная зона с признаками склеротической перестройки: дезорганизация пластинчатой структуры, очаги соединительнотканного замещения. Г. Костномозговое пространство: диффузное замещение фиброзной тканью с преобладанием коллагеновых волокон, трабекулы с редуцированными остеоцитарными лакунами

#### Методы гистологической обработки

Образцы немедленно фиксировали в 10%-м забуференном нейтральном формалине (Histosafe; Бюовитрум, РФ) в течение 24–48 ч при температуре  $+4$  °С. Декальцинацию осуществляли с использованием раствора Трилон Б («АГАТ-МЕД», Россия) до полного удаления минерального компонента. Гистологическую проводку выполняли на автоматическом карусельном процессоре (АГОТ-1, РФ) с использованием изопропиловых спиртов возрастающей концентрации. Парафинирование осуществляли с использованием реагентов производства Бюовитрум (Россия). Срезы толщиной 4 мкм изготавливали на ротационном микротоме HM340E (Thermo Fisher Scientific, США). Гистологическое окрашивание проводили гематоксилином и эозином (Бюовитрум, Россия) с использованием автоматической станции Gemini AS (Thermo Fisher Scientific, США).

#### Микроскопия и цифровая обработка

Окрашенные препараты были отсканированы на цифровом сканирующем микроскопе Panoramic 250 (3DHISTECH

Ltd., Венгрия) с объективом Plan-APOCHROMAT 20 $\times$  (Zeiss, Германия). Изучение гистологических препаратов проводили с помощью программ CaseViewer (3DHISTECH Ltd., Венгрия) и QuPath v.0.5.1 (Bankhead P. et al., Sci Rep 7, 16878, 2017).

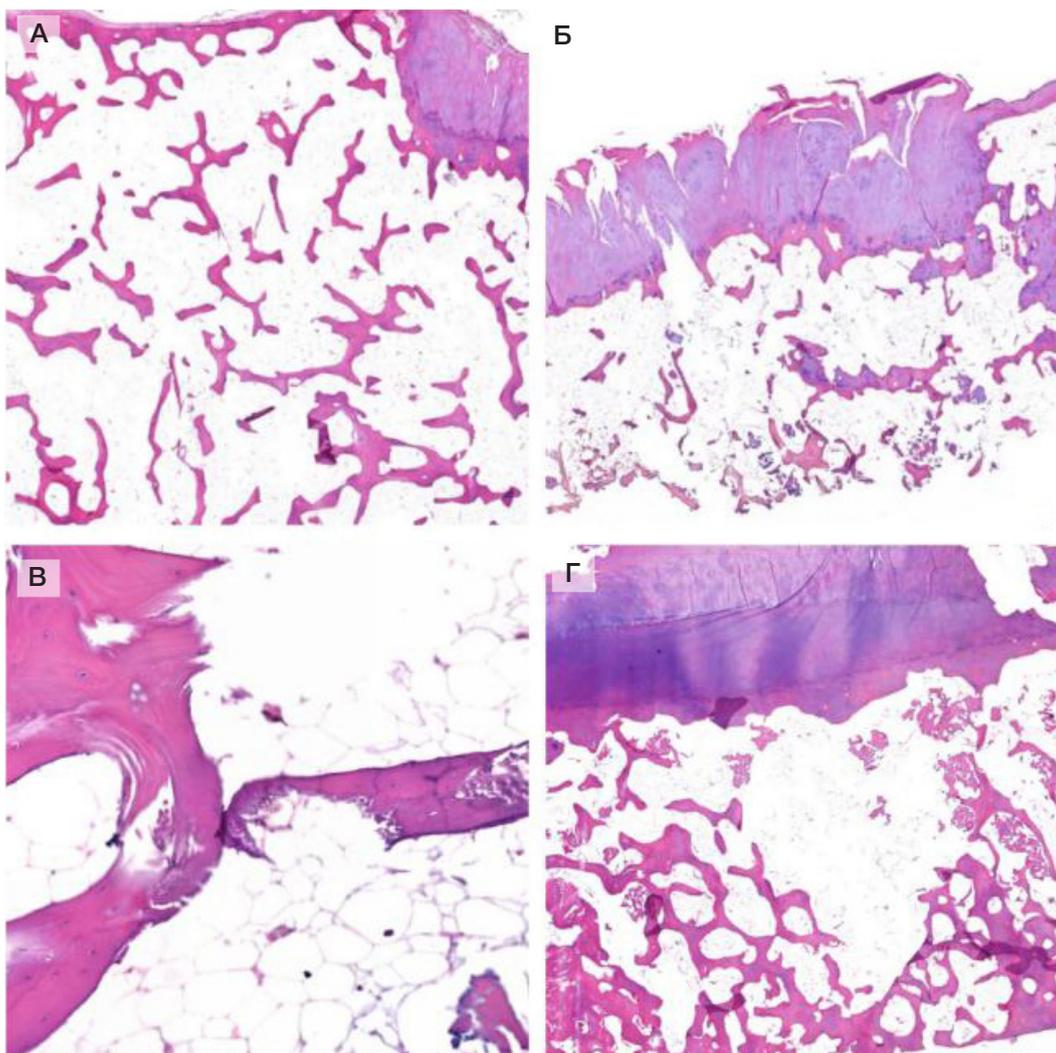
#### Морфометрический анализ

В пяти независимых полях зрения при увеличении  $\times 100$  проводили измерение следующих параметров:

- 1) толщина костных балок (мкм);
- 2) межбалочное (интертрабекулярное) расстояние (мкм);
- 3) ширина базофильной (tidemark) линии на границе хрящевой и субхондральной зоны (мкм).

При морфометрии под базофильной линией понимали зону кальцифицированного хряща, визуализируемую как интенсивно окрашенный базофильный слой в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином. Измерения выполняли на максимально перпендикулярных участках между границей хряща и началом трабекулярной кости. Учитывали ширину окрашенной полосы, а не клеточные элементы.

Морфометрию выполняли вручную с использованием функционала QuPath. Дополнительно рассчитывали



**Рис. 2.** Морфологическая характеристика участков разреженной субхондральной костной ткани при остеоартрозе. Гистологическое окрашивание гематоксилином и эозином; увеличение  $\times 20$  (А, Б),  $\times 200$  (В, Г). А. Субхондральная зона бедренной кости: истонченные трабекулы, расширенные интертрабекулярные пространства, единичные микротрещины. Б. Участок большеберцовой кости: дезорганизация трабекулярной структуры, разреженная архитектура, фрагментация костных балок. В. Паратрабекулярная зона бедренной кости: выраженные интертрабекулярные пространства, заполненные жировым костным мозгом, трабекулы с признаками истончения. Г. Костномозговое пространство большеберцовой кости: участки фиброзной трансформации, линейные дефекты в трабекулах

количество микроповреждений (микротрещин) костной ткани, приведенное к площади исследования ( $\text{мм}^2$ ).

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 13.0 (StatSoft Inc., США) и GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США). Проверку нормальности распределения выборок осуществляли с применением критерия Шапиро–Уилка. Поскольку большинство показателей не соответствовали нормальному распределению, количественные данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Ме (25–75%)). Для сравнения независимых групп использовали *U*-критерий Манна–Уитни, а при сравнении более чем двух групп — *H*-критерий Краскела–Уоллиса с последующим парным сравнением.

Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При микроскопическом изучении образцов субхондральной костной ткани бедренной и большеберцовой костей у

пациентов с остеоартрозом были выявлены характерные гистологические изменения, соответствующие двум противоположным патологическим процессам: остеосклерозу и остеопорозу.

В участках уплотненной костной ткани (УКТ) наблюдалось выраженное утолщение трабекул с увеличением продукции костного матрикса. Трабекулы плотно анастомозировали между собой, формируя грубоволокнистые структуры (рис. 1А, Б). Интертрабекулярные пространства были значительно сужены и частично замещены фиброзной тканью (рис. 1Б). В отдельных случаях отмечались очаги эндостального фиброза, дегенеративные изменения остеоцитов и локальная гиперплазия остеобластов (рис. 1В, Г).

В участках разреженной костной ткани (РКТ) была выявлена противоположная картина: выраженное истончение и фрагментация костных трабекул, расширение интертрабекулярных пространств, которые преимущественно были заполнены жировой тканью. Наблюдались множественные микротрещины в атрофированных трабекулах и единичные остеобласты при увеличенном количестве остеокластов (рис. 2).

Морфометрический анализ показал значимые различия между УКТ и РКТ по толщине костных балок и

Таблица 1. Морфометрические показатели субхондральной кости в исследуемых группах (Me (25–75%))

Показатель	Склероз: бедренная кость ( $n = 10$ )	Склероз: большеберцовая кость ( $n = 10$ )	Остеопороз: бедренная кость ( $n = 10$ )	Остеопороз: большеберцовая кость ( $n = 10$ )	H-критерий Краскела–Уоллиса ( $p$ )
Толщина трабекул, мкм	122,4 (89,1–178,6)	139,6 (99,2–193,6)	114,5 (87,8–155,9)	131,4 (95,1–180,8)	$H = 41,03$ ( $p = 0,0001$ )
Интертрабекулярное расстояние, мкм	334,7 (232,6–442,3)	300,7 (219,4–413,9)	289,7 (197,3–402,4)	310,2 (211,4–431,9)	$H = 11,01$ ( $p = 0,0001$ )
Ширина tidemark, мкм	62,5 (47,3–78,7)	66,4 (47,7–105,1)	64,3 (44,6–79,5)	81,6 (61,5–113,4)	$H = 9,55$ ( $p = 0,0229$ )

**Примечание:** значения представлены как медиана (25–75-й перцентили). Статистическую значимость парных различий между группами оценивали с использованием  $U$ -критерия Манна–Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

интертрабекулярному пространству. Толщина костных балок была достоверно выше в участках остеосклероза по сравнению с остеопорозом ( $p < 0,001$ ), при этом интертрабекулярные пространства были увеличены в областях остеопороза (табл. 1).

Морфометрический анализ показал, что в участках остеосклероза толщина трабекул в большеберцовой кости была статистически значимо выше, чем в бедренной ( $p = 0,0007$ ), тогда как интертрабекулярное расстояние, напротив, оказалось больше в бедренной кости ( $p = 0,0377$ ). В участках остеопороза трабекулы в бедренной кости были достоверно тоньше по сравнению с аналогичными зонами большеберцовой кости ( $p = 0,0001$ ). Эти различия отражают особенности локального ремоделирования субхондральной костной ткани в зависимости от анатомической области и характера нагрузки. Кроме того, ширина базофильной линии была достоверно больше в большеберцовой кости по сравнению с бедренной ( $p = 0,0035$ ) и значимо отличалась при сравнении бедренной (УКТ) и большеберцовой (РКТ) костей ( $p = 0,0113$ ).

Особый интерес представлял анализ количества микротрещин (коэффициент ломкости) в исследуемых образцах. Установлено, что медиана коэффициента ломкости была выше в участках разрежения костной ткани (РКТ) и составила 0,25 по сравнению с участками уплотнения (УКТ), где коэффициент составил 0,20 (рис. 3). Эти различия были статистически значимы ( $U$ -критерий Манна–Уитни;  $p < 0,05$ ). При сравнении полученных данных с контрольными значениями, представленными

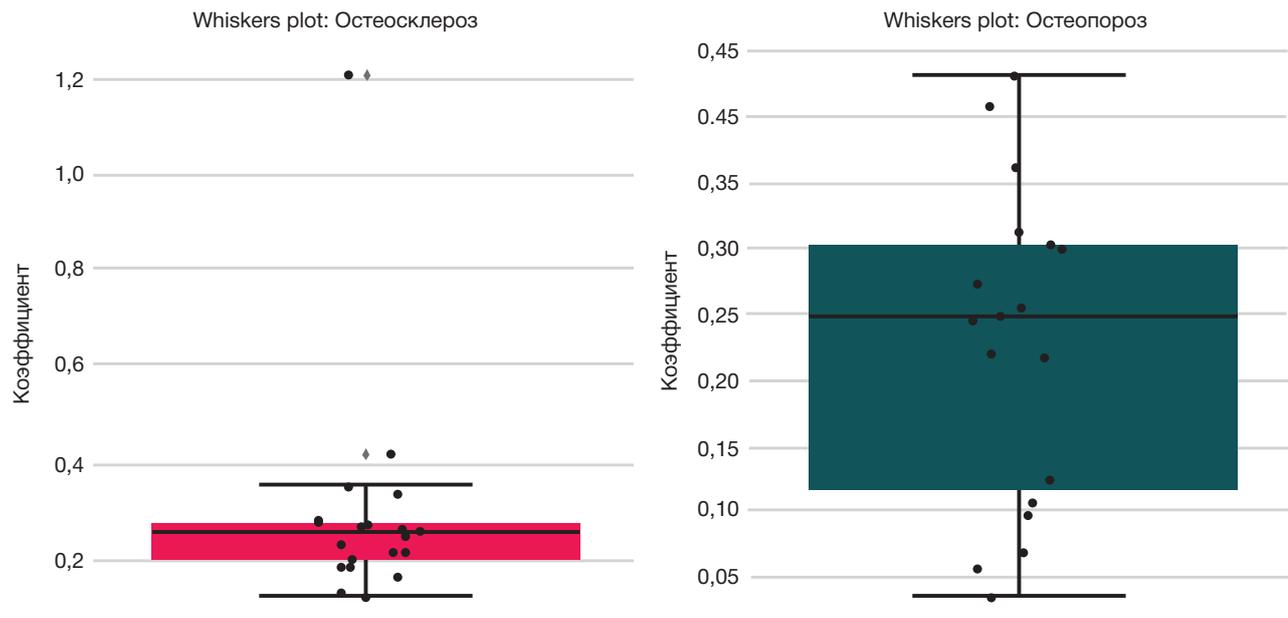
в литературе, было показано, что оба исследованных состояния характеризуются увеличением количества микротрещин относительно контроля, однако наиболее выраженные отличия от контрольной группы были зарегистрированы именно в участках остеопороза [13] (рис. 4).

### Индекс микроповреждений как прогностический критерий

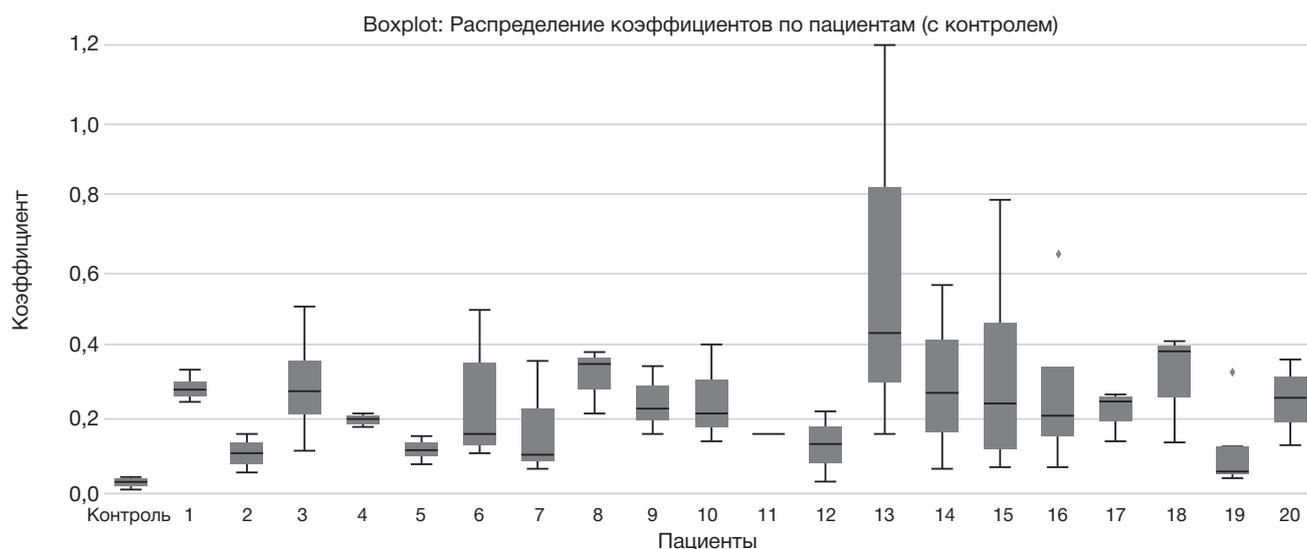
В исследуемых образцах медиана MFI в участках остеосклероза составила 0,20, в участках остеопороза — 0,25. Эти различия статистически значимы ( $p < 0,05$ ). На основании распределения значений предлагается предварительная шкала риска (табл. 2).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные демонстрируют наличие выраженных морфологических различий между участками субхондральной кости с признаками остеосклероза и остеопороза при остеоартрозе коленного сустава. Толщина трабекул была статистически значимо выше в участках склероза, тогда как интертрабекулярные пространства были расширены в зонах разрежения. Эти результаты подтверждают, что остеоартрит сопровождается гетерогенными процессами ремоделирования, направленными как на уплотнение, так и на структурную дезорганизацию костной ткани в субхондральной зоне.



**Рис. 3.** Распределение коэффициентов в участках утолщения и разрежения костной ткани. Представлены медианные значения и интерквартильный размах. В анализ включены 40 участков (по 2 от каждого пациента;  $n = 20$ ), отобранных из внутреннего и наружного мыщелков бедренной и большеберцовой костей. Участки остеопороза характеризуются достоверно более высокими значениями MFI по сравнению с участками склероза ( $p \leq 0,05$ )



**Рис. 4.** Индекс микрофрактуринга (MFI) костной ткани у пациентов с остеоартрозом (по данным участков остеосклероза и остеопороза бедренной и большеберцовой костей) по сравнению с литературными данными [13]. Представлены агрегированные значения MFI для каждого пациента ( $n = 20$ ), включающие по два участка (утолщение и разрежение). Литературные данные приведены для ориентировочного сопоставления, но не использовались в качестве контрольной группы

Структурные особенности выявленных изменений соответствуют данным литературы, в которых подчеркивается ключевая роль субхондральной кости в патогенезе остеоартроза. Начальные изменения в трабекулярной архитектуре субхондральной кости могут предшествовать хондральной дегенерации и быть связанными с нарушением механотрансдукции и микроциркуляции. В участках остеосклероза формируется уплотненная структура с атипичной ориентацией трабекул, что может приводить к нарушению амортизационной функции и увеличению нагрузки на суставной хрящ. В свою очередь, зоны остеопороза демонстрируют снижение плотности и микрофрагментацию, что может способствовать снижению прочности субхондральной зоны и повышенному риску микропереломов.

Для сопоставления полученных морфометрических характеристик использованы опубликованные в литературе данные, полученные с применением микро-КТ-визуализации у женщин в возрасте 32–37 и 78–80 лет [13]. Следует отметить, что методологические различия (оптическая микроскопия vs. микро-КТ), а также различия по возрасту и полу не позволяют использовать эти данные как прямой контроль. Однако они были привлечены как ориентировочная литературная модель для обсуждения возрастных изменений костной архитектуры.

Анализ индекса микрофрактуринга (MFI) показал его чувствительность к изменениям в морфологии кости. Более высокие значения MFI в зонах остеопороза свидетельствуют о снижении прочности костной ткани и о возможности использования этого показателя в качестве количественного прогностического критерия риска переломов и нестабильности эндопротеза. В рамках проведенного исследования MFI определяли как плотность микротрещин на единицу площади костной

ткани ( $\text{мм}^2$ ), что позволяет количественно оценивать степень микроповреждений субхондральной зоны.

Данный вывод соответствует результатам современных морфометрических исследований, в которых подчеркивается значимость оценки микроповреждений субхондральной зоны и ее взаимодействия с суставным хрящом в условиях остеоартрита [14, 15].

Повышенные значения MFI могут указывать на снижение механической прочности кости и повышенный риск развития переломов после оперативного вмешательства. В перспективе данный индекс может быть внедрен как дополнительный морфометрический критерий при планировании послеоперационного ведения пациентов, также его можно использовать для обоснования назначения терапии, направленной на ремоделирование. Дополнительные исследования, включающие клиническое наблюдение и сопоставление с данными по фактическим переломам, позволят уточнить прогностическую ценность этого показателя и определить его пороговые значения с высокой чувствительностью и специфичностью.

Таким образом, выявленные структурные особенности подтверждают необходимость учета морфологии субхондральной кости при планировании ортопедического лечения, в том числе тотального эндопротезирования.

## ВЫВОДЫ

Исследование позволило выявить, что при остеоартрозе коленного сустава субхондральная костная ткань демонстрирует выраженную морфологическую гетерогенность: в отдельных зонах преобладают признаки остеосклероза, в других — остеопороза. Морфометрический анализ показал, что в участках

**Таблица 2.** Индекс микрофрактуринга (MFI)

№	Уровень риска	Диапазон MFI	Описание состояния
1	Низкий	< 0,20	Низкое количество микротрещин, высокая структурная устойчивость
2	Средний	0,20–0,25	Умеренное количество микроповреждений, потенциальное снижение прочности
3	Высокий	≥ 0,25	Высокая плотность микротрещин, выраженная хрупкость кости

склероза трабекулы утолщены, а интертрабекулярное пространство сужено, тогда как при остеопорозе наблюдаются истончение трабекул, их фрагментация и расширение интертрабекулярных промежутков. Индекс микрофрактуринга (MFI) оказался достоверно выше в участках разрежения костной ткани, что указывает на

снижение прочности и потенциальную нестабильность кости. Эти данные свидетельствуют о возможности использования морфометрической оценки субхондральной зоны, включая показатель MFI, как прогностического инструмента при планировании ортопедических вмешательств и тотального эндопротезирования.

## Литература

- Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*. 2021; 325: 568–78. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.22171>.
- GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Lond Engl*. 2020; 396: 1204–22. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).
- Giorgino R, Albano D, Fusco S, Peretti GM, Mangiavini L, Messina C. Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *Int J Mol Sci*. 2023; 24: 6405. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms24076405>.
- Пилипович А. А., Данилов А. Б. Боль при остеоартрите: патогенез и современные возможности терапии. *Терапия*. 2020; 6-3 (37): 117–27. DOI 10.18565/therapy.2020.3.117-127.
- Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 2619. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22052619>.
- Donell S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Rev*. 2019; 4: 221–9. Available from: <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180102>.
- Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone*. 2012; 51: 204–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.010>.
- Amir G, Pirie CJ, Rashad S, Revell PA. Remodelling of subchondral bone in osteoarthritis: a histomorphometric study. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 990–2. Available from: <https://doi.org/10.1136/jcp.45.11.990>.
- Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis. *Med Clin North Am*. 2020; 104: 293–311. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>.
- Diamond LE, Grant T, Uhlrich SD. Osteoarthritis year in review 2023: Biomechanics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2024; 32: 138–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2023.11.015>.
- Chugaev DV, Kravtsov ED, Kornilov NN, Kulyaba TA. Anatomical and Biomechanical Features of the Lateral Compartment of the Knee and Associated Technical Aspects of Unicompartmental Knee Arthroplasty: Lecture. *Traumatol Orthop Russ*. 2023; 29: 144–58. Available from: <https://doi.org/10.17816/2311-2905-2042>.
- Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes*. 2020; 11: 854. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes11080854>.
- Green JO, Nagaraja S, Diab T, Vidakovic B, Guldberg RE. Age-related changes in human trabecular bone: Relationship between microstructural stress and strain and damage morphology. *J Biomech*. 2011; 44: 2279–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.05.034>.
- Zhang S, Li T, Feng Y, Zhang K, Zou J, Weng X, et al. Exercise improves subchondral bone microenvironment through regulating bone-cartilage crosstalk. *Front Endocrinol*. 2023; 14: 1159393. Available from: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1159393>.
- Román-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone remodelling and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14: A6, ar3713. Available from: <https://doi.org/10.1186/ar3713>.

## References

- Katz JN, Arant KR, Loeser RF. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis: A Review. *JAMA*. 2021; 325: 568–78. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.22171>.
- GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Lond Engl*. 2020; 396: 1204–22. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).
- Giorgino R, Albano D, Fusco S, Peretti GM, Mangiavini L, Messina C. Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *Int J Mol Sci*. 2023; 24: 6405. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms24076405>.
- Pilipovich AA, Danilov AB. Bol' pri osteoartrite: patogenez i sovremennye vozmozhnosti terapii. *Terapija*. 2020; 6-3 (37): 117–27. DOI 10.18565/therapy.2020.3.117-127. Russian.
- Jang S, Lee K, Ju JH. Recent Updates of Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment on Osteoarthritis of the Knee. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 2619. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22052619>.
- Donell S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Rev*. 2019; 4: 221–9. Available from: <https://doi.org/10.1302/2058-5241.4.180102>.
- Suri S, Walsh DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. *Bone*. 2012; 51: 204–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.10.010>.
- Amir G, Pirie CJ, Rashad S, Revell PA. Remodelling of subchondral bone in osteoarthritis: a histomorphometric study. *J Clin Pathol*. 1992; 45: 990–2. Available from: <https://doi.org/10.1136/jcp.45.11.990>.
- Abramoff B, Caldera FE. Osteoarthritis. *Med Clin North Am*. 2020; 104: 293–311. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>.
- Diamond LE, Grant T, Uhlrich SD. Osteoarthritis year in review 2023: Biomechanics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2024; 32: 138–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2023.11.015>.
- Chugaev DV, Kravtsov ED, Kornilov NN, Kulyaba TA. Anatomical and Biomechanical Features of the Lateral Compartment of the Knee and Associated Technical Aspects of Unicompartmental Knee Arthroplasty: Lecture. *Traumatol Orthop Russ*. 2023; 29: 144–58. Available from: <https://doi.org/10.17816/2311-2905-2042>.
- Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes*. 2020; 11: 854. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes11080854>.
- Green JO, Nagaraja S, Diab T, Vidakovic B, Guldberg RE. Age-related changes in human trabecular bone: Relationship between microstructural stress and strain and damage morphology. *J Biomech*. 2011; 44: 2279–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.05.034>.
- Zhang S, Li T, Feng Y, Zhang K, Zou J, Weng X, et al. Exercise improves subchondral bone microenvironment through regulating bone-cartilage crosstalk. *Front Endocrinol*. 2023; 14: 1159393. Available from: <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1159393>.
- Román-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone remodelling and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14: A6, ar3713. Available from: <https://doi.org/10.1186/ar3713>.

## ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ЭКСПРЕСС-ТЕСТА НА ПРОКАЛЬЦИТОНИН ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ

В. А. Бельченко<sup>1</sup>, И. В. Чантырь<sup>2</sup>, К. Д. Завгороднев<sup>1,2</sup>✉, Ю. И. Пахомова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Городская клиническая больница № 1 имени Н. И. Пирогова филиал Челюстно-лицевой госпиталь для Ветеранов войн, Москва, Россия,

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Стоматологические заболевания широко распространены среди населения и нередко осложняются развитием одонтогенных воспалительных процессов челюстно-лицевой области (ЧЛО), что создает потенциальный риск развития септических осложнений. Прокальцитонин (ПКТ) — перспективный биомаркер для диагностики сепсиса, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью. Однако его прогностическая ценность при гнойно-воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО) остается недостаточно изученной. Целью исследования было оценить диагностическую ценность полуколичественного экспресс-теста на ПКТ для прогнозирования септических осложнений у пациентов с ГВЗ ЧЛО, а также изучить взаимосвязь между уровнем ПКТ и клинико-лабораторными показателями. В исследование вошли 60 пациентов (73,3% мужчин, 26,7% женщин) в возрасте 21–71 года с ГВЗ ЧЛО. Уровень ПКТ определяли полуколичественным методом. Пациенты были разделены на две группы: в группе 1 ПКТ > 0,5 нг/мл (23,3%), в группе 2 ПКТ < 0,5 нг/мл (76,7%). Септические осложнения отмечены у 28,57% пациентов группы 1; в группе 2 осложнения отсутствовали ( $p = 0,001$ ; ОШ = 0,025). Статистически значимых различий по клинико-лабораторным показателям, количеству вовлеченных клетчаточных пространств ЧЛО ( $3,7 \pm 1,7$ ), длительности заболевания ( $5,17 \pm 3,39$  дня) и госпитализации ( $6,50 \pm 2,41$  койко-дней) между группами не установлено ( $p > 0,05$ ). Результаты исследования демонстрируют, что определение ПКТ полуколичественным методом является эффективным и доступным способом прогнозирования септических осложнений при ГВЗ ЧЛО.

**Ключевые слова:** прокальцитонин, сепсис, гнойно-воспалительные заболевания, челюстно-лицевая область

**Вклад авторов:** В. А. Бельченко, И. В. Чантырь — концепция и дизайн исследования; И. В. Чантырь, К. Д. Завгороднев — сбор и обработка материала; К. Д. Завгороднев, Ю. И. Пахомова — статистическая обработка данных; И. В. Чантырь, К. Д. Завгороднев, Ю. И. Пахомова — написание текста; Ю. И. Пахомова — иллюстративное сопровождение; В. А. Бельченко — редактирование.

✉ **Для корреспонденции:** Кирилл Дмитриевич Завгороднев  
ул. Лестева, д. 9, г. Москва, 115191, Россия; zheme14@mail.ru

**Статья получена:** 19.03.2025 **Статья принята к печати:** 02.04.2025 **Опубликована онлайн:** 15.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.018

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## PROGNOSTIC VALUE OF PROCALCITONIN RAPID TEST IN PURULENT INFLAMMATORY DISEASES OF THE MAXILLOFACIAL REGION

Belchenko VA<sup>1</sup>, Chantyr IV<sup>2</sup>, Zavgorodnev KD<sup>1,2</sup>✉, Pakhomova Yul<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Maxillofacial Hospital for War Veterans, Pirogov City Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Dental diseases, which exhibit high prevalence within the population, are frequently complicated by odontogenic inflammatory processes in the maxillofacial region (MFR), posing a significant risk of systemic septic complications. Procalcitonin (PCT) is a promising biomarker for the diagnosis of sepsis showing high sensitivity and specificity. However, its prognostic value for purulent inflammatory diseases of the maxillofacial region (PID-MFR) is still understudied. The study aimed to evaluate the diagnostic value of the PCT semi-quantitative rapid test for predicting septic complications in patients with PID-MFR and to evaluate the relationship between PCT levels and clinical/laboratory parameters. The study involved 60 patients (73.3% males, 26.7% females) aged between 21 and 71 years with PID-MFR. Serum PCT levels were determined by a semi-quantitative method. Patients were stratified into two groups: group 1 with PCT > 0.5 ng/mL (23.3%), group 2 with PCT < 0.5 ng/mL (76.7%). Septic complications were observed in 28.57% of patients in group 1, whereas no complications occurred in group 2 ( $p = 0.001$ ; OR = 0.025). There were no significant differences in clinical and laboratory indicators, number of cellular maxillofacial spaces affected ( $3.7 \pm 1.7$ ), disease duration ( $5.17 \pm 3.39$  days), and length of hospital stay ( $6.50 \pm 2.41$  bed-days) between groups ( $p > 0.05$ ). Our findings demonstrate that measuring PCT levels via a semi-quantitative method is an effective and accessible approach to predict septic complications of PID-MFR.

**Keywords:** procalcitonin, sepsis, purulent inflammatory diseases, maxillofacial region

**Author contribution:** Belchenko VA, Chantyr IV — study concept and design; Chantyr IV, Zavgorodnev KD — data acquisition and processing; Zavgorodnev KD, Pakhomova Yul — statistical data processing; Chantyr IV, Zavgorodnev KD, Pakhomova Yul — manuscript writing; Pakhomova Yul — illustrating; Belchenko VA — editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Kirill D. Zavgorodnev  
Lesteva, 9, Moscow, 115191, Russia; zheme14@mail.ru

**Received:** 19.03.2025 **Accepted:** 02.04.2025 **Published online:** 15.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.018

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Согласно Глобальному отчету ВОЗ о состоянии здоровья полости рта (2022), стоматологические заболевания входят в число наиболее распространенных патологических процессов, поражающих порядка 45%

мирового населения (3,5 млрд человек) [1]. Согласно статистике Стоматологической ассоциации России, в стране ежегодно регистрируют более 158 млн случаев обращений за стоматологической помощью [2]. Среди

стоматологических заболеваний преобладают поражения твердых тканей зубов, болезни пульпы и периапикальных тканей, осложненные формы которых проявляются в виде одонтогенных воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области (ЧЛО) [3]. По данным организационно-методического отдела стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Департамента здравоохранения г. Москвы (ДЗМ), около 37% взрослых пациентов, обратившихся за специализированной помощью по профилю челюстно-лицевой хирургии (ЧЛХ), требуют лечения по поводу локализованных или распространенных форм гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО) [4].

Значительная часть данной категории пациентов требует длительного лечения в связи с тяжестью состояния и высоким риском развития осложнений, включая распространение гнойного процесса по протяжению, формирование флегмон глубоких клетчаточных пространств лица и шеи, медиастенит, тромбоз вен лица и синусов головного мозга, менингита, менингоэнцефалита и др. Среди гнойно-септических осложнений одонтогенной инфекции, представляющих угрозу жизни для пациента, принято различать синдром системного воспалительного ответа, сепсис, инфекционно-токсический шок, полиорганную недостаточность [5].

Сепсис остается актуальной проблемой хирургических дисциплин, в том числе для ЧЛХ. Однако роль одонтогенной инфекции в патогенезе системного воспалительного ответа, сепсиса и связанных осложнений остается недостаточно изученной.

Несмотря на достижения современной медицины, обусловленные развитием фармакологии и внедрением новых технологий диагностики и лечения, частота инфекционно-воспалительных заболеваний стабильно высокая [2, 3, 6]. Согласно международному докладу ВОЗ по эпидемиологии и распространенности сепсиса (2020), ежегодно регистрируется 49 млн случаев сепсиса, приводящих к 11 млн смертей, что составляет пятую часть общемировых случаев смертности [7].

На протяжении последних десятилетий ученые ведут поиски оптимального метода диагностики септических осложнений [8]. Особый интерес представляет сывороточный прокальцитонин (ПКТ) как высокочувствительный и специфичный маркер сепсиса [9, 10]. Повышение уровня ПКТ у пациентов с бактериальными инфекциями впервые описано в 1993 г. [11].

В норме ПКТ синтезируется в парафолликулярных С-клетках щитовидной железы и образуется из предшественников под воздействием эндопептидаз эндоплазматического ретикулума. Далее он распадается до кальцитонина и побочных продуктов, что объясняет его минимальную концентрацию в крови у здорового человека. При развитии синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) синтез ПКТ осуществляется по альтернативному пути, детали которого, на сегодняшний день, недостаточно изучены. В рамках ССВР ПКТ могут синтезировать различные органы и ткани в ответ на воздействие бактериальных эндотоксинов и провоспалительных медиаторов [12].

Повышенный уровень ПКТ сыворотки крови ассоциирован с неблагоприятным прогнозом, что подтверждает значимость определения этого биомаркера для выбора оптимальной тактики лечения [9]. Многочисленные исследования подтверждают диагностическую ценность ПКТ в диагностике воспалительных заболеваний, однако

его прогностическая значимость у пациентов с ГВЗ ЧЛО изучена недостаточно, что определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования — оценить прогностическую ценность полуколичественного экспресс-теста на ПКТ у пациентов с ГВЗ ЧЛО в качестве скринингового метода оценки риска развития септических осложнений и проанализировать взаимосвязь уровня ПКТ с клинико-лабораторными показателями.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Ретроспективное когортное исследование с элементами проспективного аналитического наблюдения проводили на базе монопрофильного стационарного комплекса ГБУЗ «ГКБ № 1 имени Н. И. Пирогова ДЗМ филиал Челюстно-лицевой госпиталь для Ветеранов войн», специализирующегося на оказании медицинской помощи взрослым пациентам по профилю «челюстно-лицевая хирургия и стоматология». Исследованием руководил главный внештатный специалист по ЧЛХ ДЗМ, д.м.н., профессор В. А. Бельченко.

В период с 12.03.24 по 23.09.24 в приемное отделение обратилось 1784 пациента с ГВЗ ЧЛО. В исследование включили 60 пациентов, из них 44 мужчины (73,33%) и 16 женщин (26,67%), в возрасте 21–71 года (средний возраст составил  $42,07 \pm 13,81$  года). Среди включенных пациентов 68,3% ( $n = 41$ ) были трудоустроены, 31,7% ( $n = 19$ ) — нет. Госпитализация в стационар была осуществлена по следующим каналам поступления: скорая медицинская помощь — 15,00% ( $n = 9$ ) пациентов, 103-поликлиника — 85,00% ( $n = 51$ ).

Расчет минимального объема выборки осуществляли по формуле Н. М. Будерера, с доверительным интервалом 10%. Минимальный объем выборки для данного исследования составил 43 пациента.

Критерии включения: пациенты с ГВЗ ЧЛО в возрасте 18–75 лет; наличие оформленного информированного добровольного согласия на обследование и лечение; пациенты, не принимавшие антибактериальные препараты на догоспитальном этапе; стабильные и относительно стабильные пациенты в соответствии с зелеными и желтыми потоками системы триаж; уровень С-реактивного белка (СРБ) в биохимическом анализе крови  $\geq 180$  мг/л; выполненный полуколичественный экспресс-тест «ИХА Прокальцитонин».

Критерии исключения: пациенты младше 18 лет и старше 75 лет; отказ пациента от обследования и лечения; прием пациентом антибактериальных препаратов на догоспитальном этапе; пациенты, имеющие жизнеугрожающие состояния и нуждающиеся в реанимационных мероприятиях в соответствии с красным потоком системы триаж; несоответствие лабораторных критериев и отсутствие показаний к выполнению полуколичественного теста «ИХА Прокальцитонин».

При анализе публикаций выявлена значительная вариабельность уровня СРБ у пациентов с ГВЗ ЧЛО. По результатам исследования, посвященного ранней диагностике сепсиса (2021), диапазон концентрации СРБ составил 82,50–95,35 мг/л [13]. В другой работе 2021 г. при одонтогенных инфекциях зафиксирован средний уровень СРБ 140 мг/л [14]. По данным исследования 2024 г. средние значения уровня СРБ при госпитализации составили 185,2 мг/л у мужчин и 189,4 мг/л у женщин [15]. Диагностический порог СРБ в текущем исследовании нами установлен на уровне 180 мг/л [13–15].

Таблица 1. Критерии сортировки пациентов на зеленый, желтый и красный потоки по системе триажного осмотра

Показатель	Зеленый поток	Желтый поток	Красный поток
ЧСС, уд./мин	60–90	40–60 90–100	< 40 > 130
ЧДД, за 1 мин	8–16	16–25	> 30
АД, мм рт. мт	110/60–140/110	<110/60 >140/110	< 75/30 > 240/140
SpO <sub>2</sub> , %	> 95	92–95	< 90
Т °С	36,0–37,5	35,0–36,0 37,5–39,0	< 35,0 > 40,0
Шкала падений Морсе	0–25	25–50	> 50
Шкала комы Глазго	15	14	< 13
Шкала боли	1–3	4–7	8–10

Всем пациентам, обратившимся в приемное отделение, был проведен триажный осмотр. Критерии медицинской сортировки пациентов на зеленый, желтый и красный потоки представлены в табл. 1.

Первичный осмотр пациентов проводили челюстно-лицевой хирург и врач-терапевт. Сразу после осмотра выполняли следующие дополнительные исследования: 1) лабораторные — клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, коагулограмму; 2) инструментальные — МСКТ органов грудной клетки и ЧЛО. На основании результатов обследования и критериев включения проводили отбор пациентов и определение уровня ПКТ крови полуколичественным методом с применением экспресс-теста «ИХА Прокальцитонин 500» (ООО «Академинновация», Россия) (рис. 1).

Тест-системы «ИХА Прокальцитонин 500» предназначены для быстрого полуколичественного определения ПКТ в сыворотке и плазме крови человека *in vitro*. Метод основан на принципе иммунохроматографического анализа. При добавлении сыворотки или плазмы крови пациента (четыре капли) на тест-полоску происходит взаимодействие со специфичными моноклональными антителами к ПКТ, конъюгированными с окрашенным маркером. Образующийся комплекс, проходя через аналитическую зону с иммобилизованными на мембране специфичными антителами, формирует окрашенный комплекс: иммобилизованные антитела – прокальцитонин – антитела

с маркером. Появление в тестовом окне кассеты двух параллельных окрашенных линий («С» и «Т») указывает на положительный результат, при котором концентрация ПКТ превышает 0,5 нг/мл. Наличие только одной окрашенной контрольной линии «С» свидетельствует об отрицательном результате, указывая на отсутствие ПКТ в образце или его концентрацию ниже 0,5 нг/мл. Отсутствие окрашенных линий в тестовом окне либо появление только аналитической линии «Т» означает, что результат анализа недействителен.

На основании результатов обследования принимали решение о тактике ведения пациента: госпитализация и оперативное лечение в монопрофильном стационаре или перевод в многопрофильный стационар.

Ретроспективно выполняли сбор данных и анализ медицинских карт пациентов (форма 003/у). Полученные результаты исследования внесли в таблицу и обрабатывали статистически с использованием программного обеспечения StatTech v. 4.0.5 («Статтех», Россия).

Проведенный статистический анализ включал оценку нормальности распределения количественных показателей с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Параметры с нормальным распределением представлены в виде среднего арифметического (M) со стандартным отклонением (SD) и 95%-м доверительным интервалом (ДИ), тогда как категориальные данные

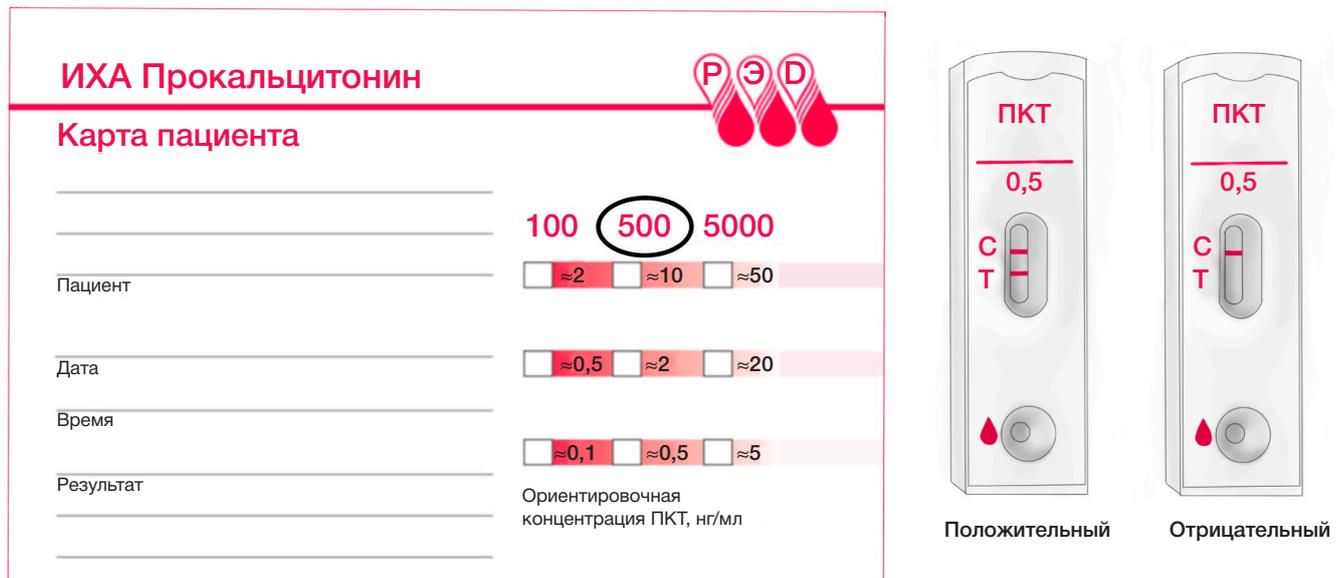


Рис. 1. Набор для проведения теста «ИХА Прокальцитонин 500» (рисунок авторский)

Таблица 2. Сравнительная характеристика исследуемых групп пациентов

Клинические характеристики	ПКТ > 0,5 нг/мл	ПКТ < 0,5 нг/мл
Пол	Мужчины — 85,71% (n = 12) Женщины — 14,29% (n = 2)	Мужчины — 69,57% (n = 32) Женщины — 30,43% (n = 14)
Возраст	46,21 ± 17,40 лет	40,80 ± 12,48 лет
Диагноз	K12.2 — 14,29% (n = 2) L03.2 — 85,71% (n = 12)	K12.2 — 19,57% (n = 9) L03.2 — 80,43% (n = 37)
Сопутствующие заболевания	Заболевания сердечно-сосудистой системы — 42,86% (n = 6) Сахарный диабет — 7,14% (n = 1) Заболевания дыхательной системы — 7,14% (n = 1)	Заболевания сердечно-сосудистой системы — 30,43% (n = 14) Заболевания желудочно-кишечного тракта — 10,87% (n = 5) Ожирение — 42,86% (n = 6) Анемия — 10,87% (n = 5) Заболевания нервной системы — 6,52% (n = 3) Нарушение толерантности к глюкозе — 6,52% (n = 3) Сахарный диабет — 4,34% (n = 2)
Среднее время от начала заболевания	5,79 ± 5,04	4,98 ± 2,75
Среднее число койко-дней среди полностью пролеченных в стационаре	7,6 ± 1,80	7,02 ± 1,44
Хирургический доступ	Внутриротовой — 14,29% (n = 2) Наружный — 64,29% (n = 9)	Внутриротовой — 19,57% (n = 9) Наружный — 80,43% (n = 37)

выражены абсолютными значениями и процентными долями с расчетом 95%-го ДИ по методу Клоппера–Пирсона. Сравнение групп по количественным признакам осуществляли с применением *t*-критерия Стьюдента для выборок с равными дисперсиями и *t*-критерия Уэлча при неравных дисперсиях. Анализ качественных показателей проводили с помощью точного критерия Фишера для таблиц сопряженности. Величину эффекта оценивали через отношение шансов с 95%-м ДИ, при наличии нулевых значений в ячейках таблицы применяли коррекцию Холдейна–Энскомба. Во всех случаях статистически значимыми считали различия при уровне  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании результатов полуколичественного теста «ИХА Прокальцитонин» пациенты были разделены на две группы. В первую группу включили 14 пациентов (23,3%), уровень ПКТ сыворотки крови составил > 0,5 нг/мл. Во вторую группу — 46 пациентов (76,7%), уровень ПКТ сыворотки крови которых составил < 0,5 нг/мл. Сравнительная характеристика групп пациентов представлена в табл. 2.

Временной интервал от появления симптомов до обращения за медицинской помощью составил от 1 до 21 дня со средним значением  $5,17 \pm 3,39$  дня (95% ДИ: 4,29–6,04).

Количество вовлеченных в воспалительный процесс клетчаточных пространств ЧЛО варьировало от 1 до 8 при среднем значении 3,7 (95% ДИ: 3,27–4,13). Значение показателя моды по данному параметру также соответствовало 4,00 (рис. 2).

Анализ этиологических факторов показал, что в 50,0% случаев ( $n = 30$ ) ГВЗ ЧЛО развивались на фоне обострения хронического периодонтита постоянных зубов, преимущественно нижних моляров. Удаление постоянных зубов, выполненное в амбулаторных условиях, послужило причиной воспаления в 31,67% наблюдений ( $n = 19$ ), при этом в 18,33% ( $n = 11$ ) оно было связано с экстракцией ретинированных нижних третьих моляров. Острый гнойный перикоронит в области нижних третьих моляров диагностировали у 6,67% пациентов ( $n = 4$ ). В единичных случаях (по 1,67%,  $n = 1$ ) этиологическими факторами выступали острый гнойный паротит, осложнения эндодонтического лечения нижних вторых моляров, переимплантит нижней

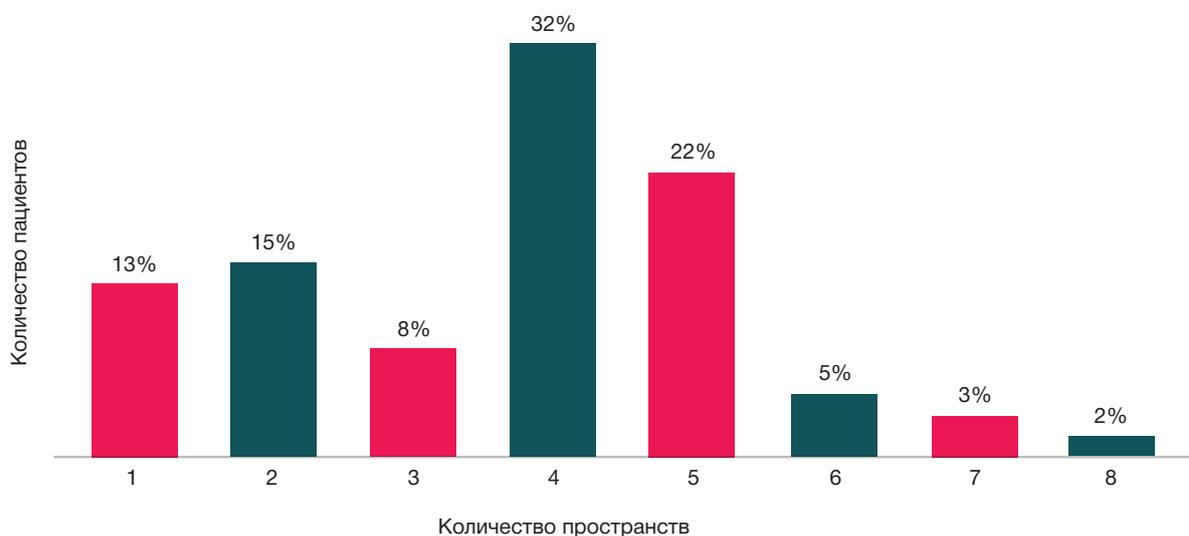


Рис. 2. Мода количества клетчаточных пространств ЧЛО, вовлеченных в воспалительный процесс

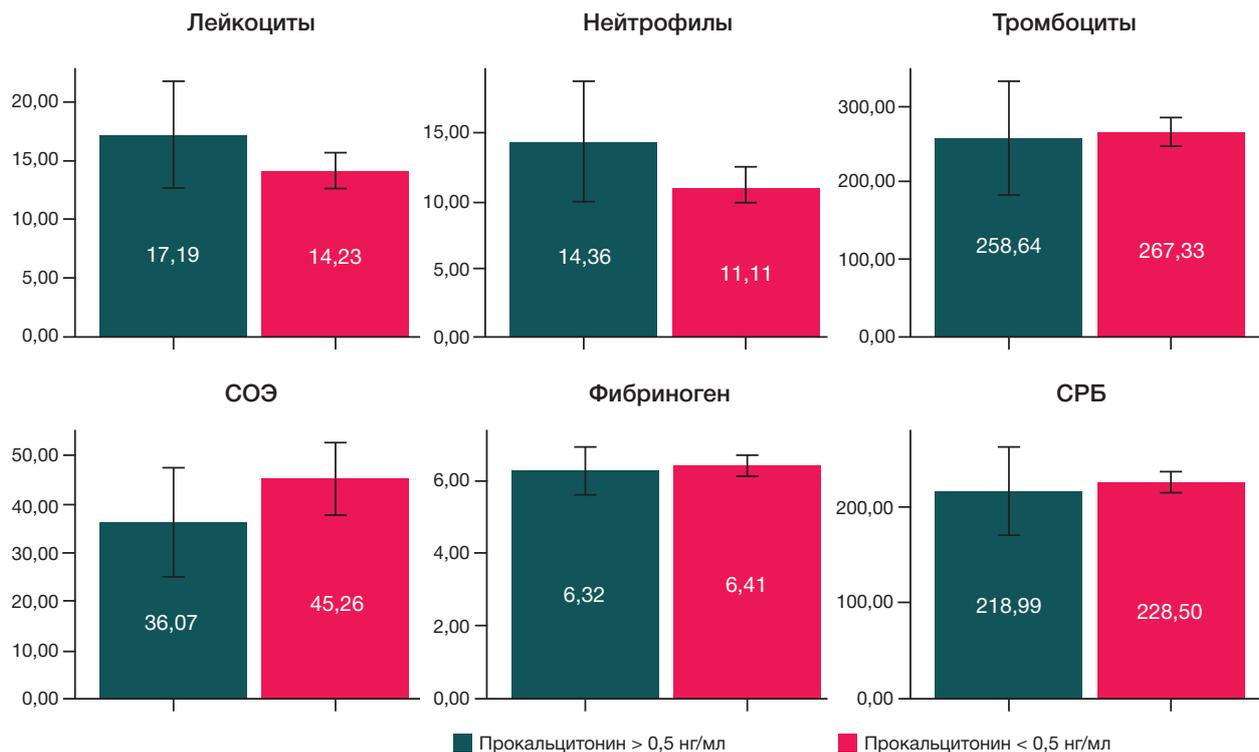


Рис. 3. Зависимость основных лабораторных показателей воспаления от уровня прокальцитонина

челюсти, нагноение костной раны после перелома нижней челюсти и нагноение ран мягких тканей.

Среди включенных в исследование 95% пациентов ( $n = 57$ ) были госпитализированы в отделение ЧЛХ круглосуточного стационара. На этапе обследования перед экстренной госпитализацией 3,33% пациентов ( $n = 2$ ) были переведены в многопрофильные стационары г. Москвы в связи с декомпенсацией общесоматических заболеваний на фоне выраженного ССВР; еще 1,67% пациентов ( $n = 1$ ) были переведены из-за высокого риска развития интра- и послеоперационных осложнений, обусловленного отечно-инфильтративным ларингитом.

В зависимости от локализации воспалительного процесса санацию воспалительного очага проводили внутривидовым доступом у 18,33% ( $n = 11$ ), наружным доступом — у 76,67% ( $n = 46$ ).

В ходе оперативного вмешательства у всех пациентов был выполнен забор материала для бактериологического посева на микрофлору. По результатам микробиологического анализа, наиболее частыми возбудителями ГВЗ ЧЛО были *Streptococcus viridans* — 31,58% ( $n = 18$ ) и *Neisseria spp.* — 14,04% ( $n = 8$ ). Реже выявлялись колонии *Streptococcus oralis* — 10,52% ( $n = 6$ ), *Streptococcus constellatus* — 7,01% ( $n = 4$ ), *Streptococcus pyogenes* — 7,01% ( $n = 4$ ), *Streptococcus anginosus* — 5,26% ( $n = 3$ ), *Staphylococcus aureus* — 3,51% ( $n = 2$ ), *Staphylococcus warneri* — 3,51% ( $n = 2$ ), *Eikenella corrodens* — 1,75% ( $n = 1$ ), *Enterobacter cloacae* — 1,75% ( $n = 1$ ) и *Acinetobacter baumannii* — 1,75% ( $n = 1$ ). В 14,04% случаев ( $n = 8$ ) были обнаружены полимикробные ассоциации, представленные сочетанием *Streptococcus viridans* и *Neisseria spp.* В 17,54% случаев ( $n = 10$ ) роста микроорганизмов не наблюдалось.

Срок госпитализации пациентов варьировался в диапазоне 4–11 койко-дней, при норме медико-экономического стандарта (МЭС 73.180) — 8 койко-дней. У пациентов с уровнем ПКТ > 0,5 нг/мл длительность госпитализации составляла в среднем  $7,6 \pm 1,80$

койко-дней, с ПКТ < 0,5 нг/мл —  $7,02 \pm 1,44$ . Средний срок пребывания в стационаре составил  $6,50 \pm 2,41$  койко-дней.

Анализ корреляции между уровнем ПКТ и лабораторными показателями воспаления у пациентов с ГВЗ ЧЛО не выявил статистически значимых различий ( $p > 0,05$ ) (использовали  $t$ -критерий Стьюдента и  $t$ -критерий Уэлча). Результаты представлены на рис. 3.

При анализе не выявлено статистически значимой корреляции между уровнем ПКТ и следующими параметрами: продолжительностью госпитализации (койко-дни), количеством вовлеченных клетчаточных пространств и длительностью заболевания ( $p > 0,05$ ) (использовали  $t$ -критерий Стьюдента и точный критерий Фишера).

По результатам анализа вероятности развития осложнений в зависимости от уровня ПКТ сыворотки крови установлено, что у 4 из 14 пациентов (28,57%) с положительным результатом теста были диагностированы осложнения, связанные с развитием ССВР, сепсиса, инфекционно-токсического шока. С учетом полученных данных были выявлены статистически значимые различия ( $p = 0,001$ ) (использовали точный критерий Фишера). Результаты проведенного анализа представлены на рис. 4.

Вероятность развития осложнений в группе с отрицательными результатами была ниже в 39,86 раза, по сравнению с группой с положительным значением прокальцитонина сыворотки крови, различия шансов были статистически значимыми (ОШ = 0,025; 95% ДИ: 0,001–0,503).

При оценке вероятности развития осложнений в зависимости от возраста пациентов установлены статистически значимые различия ( $p > 0,05$ ) (использовали  $t$ -критерий Стьюдента). Результаты проведенного анализа представлены на рис. 5.

Положительная прогностическая ценность полуколичественного теста «ИХА прокальцитонин 500» составила 28,57%.

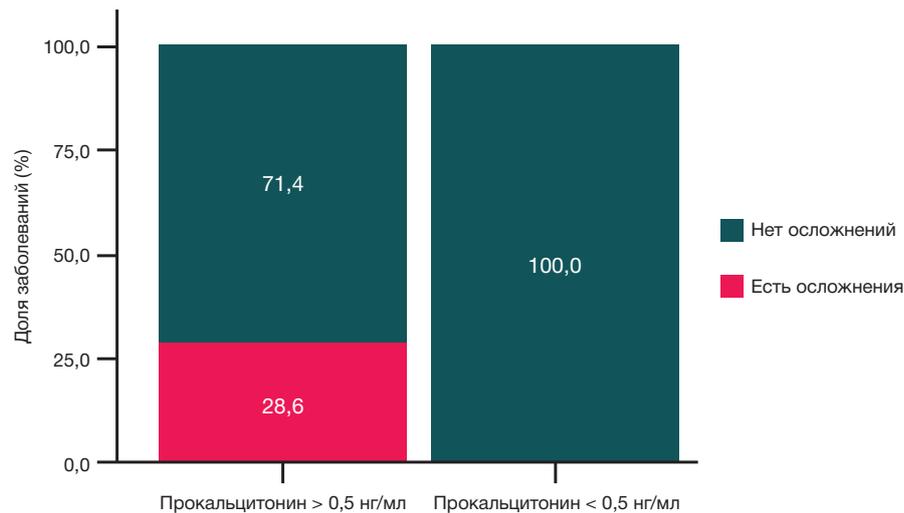


Рис. 4. Анализ развития осложнений в зависимости от уровня прокальцитонина

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вероятность развития септических осложнений при ГВЗ ЧЛО относительно невысока. Так, при анализе данных 483 пациентов с ГВЗ ЧЛО в одном из исследований сепсис был диагностирован у 3,3% [16]. Тем не менее, при разработке тактики диагностики и лечения необходимо учитывать потенциальные осложнения, так как ГВЗ ЧЛО тяжелой степени могут привести к жизнеугрожающим состояниям, требующим мультидисциплинарного подхода.

В период с 2001 по 2016 г. диагностика сепсиса была основана на наличии двух или более признаков ССВР. Из-за недостаточной точности этого подхода концепция была пересмотрена. В 2016 г. принят «Третий международный консенсус по определению сепсиса и септического шока (Sepsis-3)», согласно которому сепсис определяется как жизнеугрожающая органная дисфункция, вызванная нарушением регуляции ответа организма на инфекцию [17]. Схематичное изображение патогенеза одонтогенного сепсиса представлено на рис. 6.

Продемонстрировано, что стандартные клинико-лабораторные показатели воспалительного процесса не обладают достаточной точностью для прогнозирования вероятности развития тяжелых септических осложнений [18]. Своевременная диагностика данного состояния позволяет начать лечение на более раннем этапе, что

способствует улучшению состояния пациента и может играть ключевую роль в его выздоровлении. Результаты исследований свидетельствуют, что уровень ПКТ — надежный прогностический маркер развития сепсиса [8, 10, 18]. Важное преимущество ПКТ в его быстром появлении в сыворотке крови — через 3–4 ч после синтеза, с достижением пиковой концентрации через 6–12 ч и периодом полураспада около 24 ч. При эффективной терапии уровень ПКТ снижается на 50% ежедневно. В отличие от этого, для микробиологических методов требуется не менее 2 суток для получения результатов и в 60–70% случаев они могут давать ложноотрицательные результаты [8, 18]. Таким образом, определение уровня ПКТ с использованием экспресс-теста «ИХА Прокальцитонин» и его аналогов обеспечивает оперативное принятие решений, что существенно улучшает прогноз для пациента.

В ходе проведенного исследования были проанализированы клинико-лабораторные данные двух групп пациентов с ГВЗ ЧЛО. У 23,33% обследованных был выявлен положительный результат экспресс-теста на ПКТ, при этом у 28,57% из них зафиксировано развитие осложнений. Статистически значимых различий по основным клинико-лабораторным показателям (продолжительность госпитализации, количество вовлеченных клетчаточных пространств, длительность заболевания до поступления, уровни лейкоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов, СОЭ, СРБ,

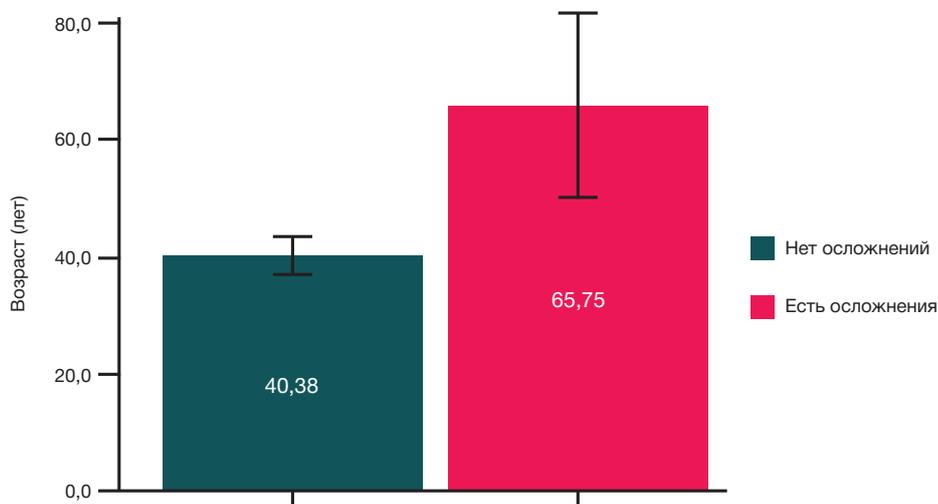


Рис. 5. Анализ развития осложнений в зависимости от возраста пациента

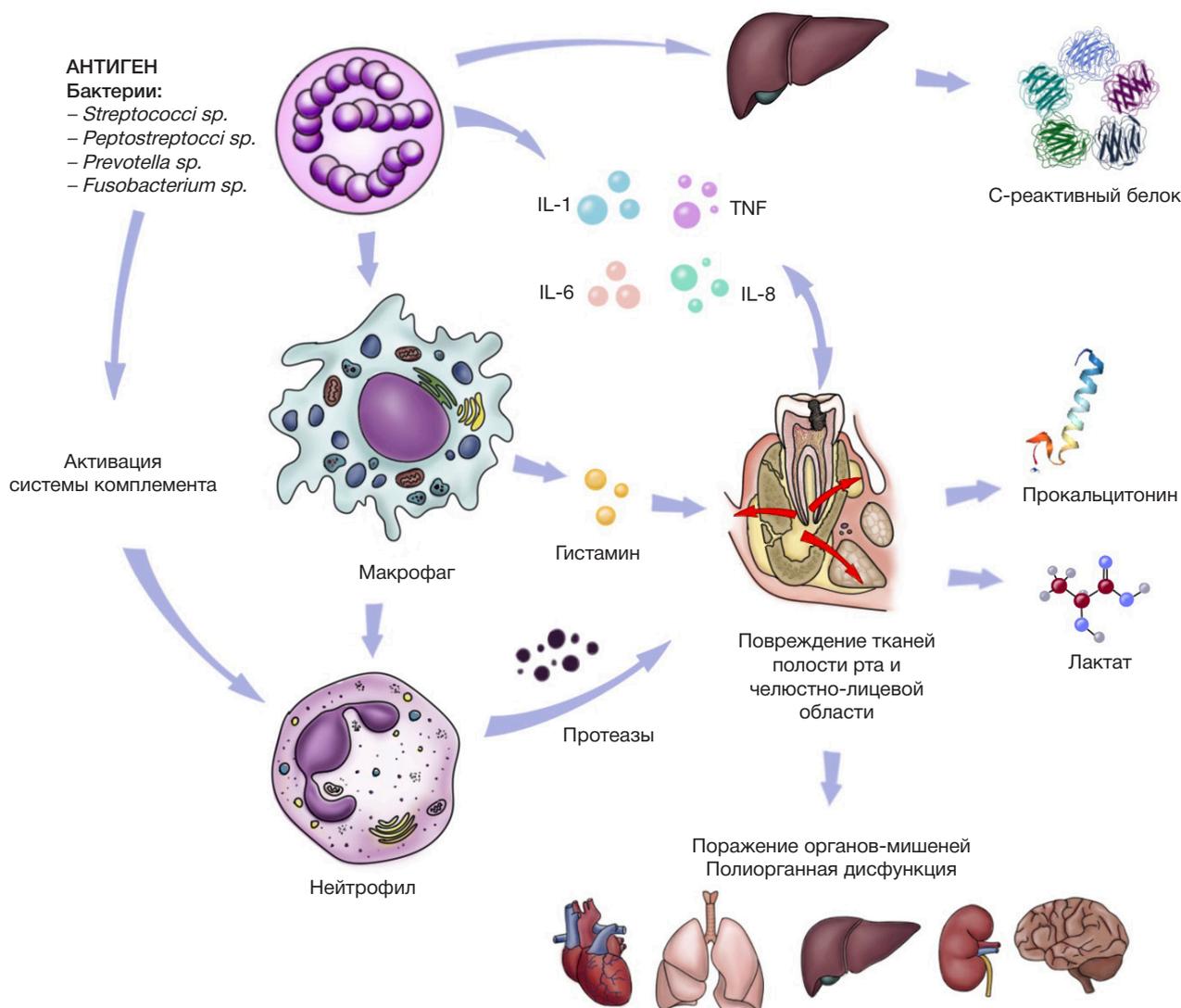


Рис. 6. Схема патогенеза развития одонтогенного сепсиса (рисунок авторский)

фибриногена) между группами не выявлено. Установлена достоверная связь между положительным результатом экспресс-теста на ПКТ, возрастом пациентов и повышенным риском развития осложнений ГВЗ ЧЛО. Полученные результаты согласуются с данными, представленными в опубликованных исследованиях, что подтверждает целесообразность включения данного лабораторного теста в клиническую практику челюстно-лицевого хирурга в качестве скринингового метода [14, 18].

Ограничением данного исследования является небольшой объем выборки.

Преобладание пациентов, госпитализированных из амбулаторных учреждений (85%), подтверждает возможность догоспитального использования теста совместно с клиническими оценочными шкалами. Полуколичественный экспресс-тест на ПКТ сочетает в себе диагностическую эффективность с практичностью применения, что делает его перспективным скрининговым методом диагностики и прогнозирования осложнений как в амбулаторных, так и в стационарных условиях.

## ВЫВОДЫ

Применение полуколичественного экспресс-теста на ПКТ продемонстрировало свою эффективность в оценке риска септических осложнений у пациентов с ГВЗ ЧЛО. Отсутствие достоверной корреляции между уровнем ПКТ и показателями воспаления (СРБ, лейкоциты, фибриноген), а также клиническими параметрами (длительность госпитализации, количество вовлеченных анатомических областей) подчеркивает его независимую прогностическую значимость при оценке выраженности системного воспалительного ответа. Положительная прогностическая ценность теста (28,57%) и выявленные статистически значимые различия между группами подтверждают целесообразность его использования в клинической практике. Внедрение экспресс-теста на ПКТ соответствует современным стандартам специализированной медицинской помощи, способствуя ранней диагностике и обоснованному выбору лечебной тактики.

## Литература

- Global oral health status report. Towards universal health coverage for oral health by 2030. 2022. Sсылка активна на 24.12.2024. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>.
- Рабинович С. А., Заводиленко Л. А. Материалы 21-го Всероссийского стоматологического форума. Безопасное обезболивание в стоматологии. Российская стоматология. 2024; 17 (3): 75–76. Доступно по ссылке: <http://doi.org/10.17116/rosstomat20241703140>.
- Салахов А. К., Ксембаев С. С., Байкеев Р. Ф., Силагадзе Е. М. Стоматологическая заболеваемость населения России. Казанский медицинский журнал. 2020; 101 (5): 713–8. Доступно по ссылке: <http://doi.org/10.17816/KMJ2020-713>.
- Бельченко В. А., Чантырь И. В. Маршрутизация пациентов с челюстно-лицевой патологией в условиях мегаполиса: вызовы и решения. Здоровье мегаполиса. 2022; 3 (3): 46–57. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.47619/2713-2617.zm.2022.v.3i3;46-57>.
- Рыбакова М. Г. Сепсис: от синдрома системной воспалительной реакции до органной дисфункции. Архив патологии. 2021; 83 (1): 67–72. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17116/ptol20218301167>.
- Байрамова С. С., Цыганкова О. В., Николаев К. Ю., Тимошенко О. В., Насиров Ш. Т., Старичков А. А. Применение полуколичественного экспресс-теста на прокальцитонин в диагностике внебольничной пневмонии у пациентов с ВИЧ-инфекцией. Вестник терапевта. 2024; 2 (63): 28–36. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.31550/2712-8601-VT-2024-2-4>.
- Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions. Geneva: World Health Organization; 2020. Ссылка активна на 24.12.2024. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010789>.
- Yankov YG, Bocheva Y. Comparative Characterization of Procalcitonin (Sensitivity, Specificity, Predictability, and Cut-Off Reference Values) as a Marker of Inflammation in Odontogenic Abscesses of the Head and Neck in the Female Population. Cureus Journal. 2023; 15 (11): e48207. Available from: <https://doi.org/10.7759/cureus.48207>.
- Paudel R, Dogra P, Montgomery-Yates AA, Coz Yataco A. Procalcitonin: A promising tool or just another overhyped test? International Journal of Medical Sciences. 2020; 17 (3): 332–7. Available from: <https://doi.org/10.7150/ijms.39367>.
- Кабанова А. А., Походенко-Чудакова И. О., Кабанова С. А. Синдром системного воспалительного ответа и сывороточный прокальцитонин при одонтогенной инфекции челюстно-лицевой области. Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. 2023; 31 (1): 119–25. Available from: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ106281>.
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet Journal. 1993; 341 (8844): 515–28. Available from: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90277-n](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90277-n).
- Aloisio E, Dolci A, Panteghini M. Procalcitonin: Between evidence and critical issues. Clinica Chimica Acta Journal 2019; 496: 7–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.06.010>.
- Hausfater P, Robert Boter N, Morales Indiano C, Cancellata de Abreu M, Marin AM, Pernet J, Quesada D, Castro I, Careaga D, Arock M, Tejdor L, Velly L. Monocyte distribution width (MDW) performance as an early sepsis indicator in the emergency department: comparison with CRP and procalcitonin in a multicenter international European prospective study. Crit Care. 2021; 25 (1): 227. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03622-5>.
- Bègue L, Schlund M, Raoul G, Ferri J, Lauwers L, Nicot R. Biological factors predicting the length of hospital stay in odontogenic cellulitis. Journal of Stomatology oral and Maxillofacial Surgery. 2021; 123 (3): 303–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jjomas.2021.07.007>.
- Новикова И. С., Гуленко О. В., Гербова Т. В. Оценка уровня ферритина и С-реактивного белка у пациентов с одонтогенными флегмонами челюстно-лицевой области. Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2024; 8 (4): 49–54. Available from: <https://doi.org/10.17116/operhirurg2024804149>.
- Weise H, Naros A, Weise C. Severe odontogenic infections with septic progress — a constant and increasing challenge: a retrospective analysis. BMC Oral Health Journal. 2019; 19 (1): 173. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0866-6>.
- Dave M, Barry S, Coulthard P. An evaluation of sepsis in dentistry. British Dental Journal. 2021; 230 (6): 351–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41415-021-2724-6>.
- Kim J-K, Lee J-H. Clinical utility of procalcitonin in severe odontogenic maxillofacial infection. Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery Journal. 2021; 43 (1): 3. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40902-020-00288-x>.

## References

- Global oral health status report. Towards universal health coverage for oral health by 2030. 2022. Sсылка активна на 24.12.2024. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>.
- Rabinovich SA, Zavodilenko LA. Materialy 21-go Vserossijskogo stomatologicheskogo foruma. Bezopasnoe obezbolivanie v stomatologii. Rossijskaja stomatologija. 2024; 17 (3): 75–76. Dostupno po sssylke: <http://doi.org/10.17116/rosstomat20241703140>. Russian.
- Salahov AK, Ksembaev SS, Bajkeev RF, Silagadze EM. Stomatologicheskaja zaboлеваemost' naselenija Rossii. Kazanskij medicinskij zhurnal. 2020; 101 (5): 713–8. Dostupno po sssylke: <http://doi.org/10.17816/KMJ2020-713>. Russian.
- Belchenko VA, Chantyr IV. Marshrutizacija pacientov s cheljstno-licevoj patologiej v uslovijah megapolisa: vyzovy i reshenija. Zdorov'e megapolisa. 2022; 3 (3): 46–57. Dostupno po sssylke: <https://doi.org/10.47619/2713-2617.zm.2022.v.3i3;46-57>. Russian.
- Rybakova MG. Sepsis: ot sindroma sistemnoj vospalitel'noj reakcii do organnoj disfunkcii. Arhiv patologii. 2021; 83 (1): 67–72. Dostupno po sssylke: <https://doi.org/10.17116/ptol20218301167>. Russian.
- Bajramova SS, Cygankova OV, Nikolaev KYu, Timoshhenko OV, Nasirova SH, Starichkov A A. Primenenie polukolichestvennogo jekspress-testa na prokal'citonin v diagnostike vnebol'nicnoj pnevmonii u pacientov s VICH-infekciej. Vestnik terapevta. 2024; 2 (63): 28–36. Dostupno po sssylke: <https://doi.org/10.31550/2712-8601-VT-2024-2-4>. Russian.
- Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future directions. Geneva: World Health Organization; 2020. Ссылка активна на 24.12.2024. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010789>.
- Yankov YG, Bocheva Y. Comparative Characterization of Procalcitonin (Sensitivity, Specificity, Predictability, and Cut-Off Reference Values) as a Marker of Inflammation in Odontogenic Abscesses of the Head and Neck in the Female Population. Cureus Journal. 2023; 15 (11): e48207. Available from: <https://doi.org/10.7759/cureus.48207>.
- Paudel R, Dogra P, Montgomery-Yates AA, Coz Yataco A. Procalcitonin: A promising tool or just another overhyped test? International Journal of Medical Sciences. 2020; 17 (3): 332–7. Available from: <https://doi.org/10.7150/ijms.39367>.
- Kabanova AA, Pohodenko-Chudakova IO, Kabanova SA. Sindrom sistemnogo vospalitel'nogo otveta i syvorotochnyj prokal'citonin pri odontogennoj infekcii cheljstno-licevoj oblasti. Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I. P. Pavlova. 2023; 31 (1): 119–25. Available from: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ106281>. Russian.
- Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohuon C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet Journal. 1993; 341 (8844): 515–28. Available from: [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90277-n](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90277-n).
- Aloisio E, Dolci A, Panteghini M. Procalcitonin: Between evidence and critical issues. Clinica Chimica Acta Journal 2019; 496: 7–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.06.010>.
- Hausfater P, Robert Boter N, Morales Indiano C, Cancellata de Abreu M, Marin AM, Pernet J, Quesada D, Castro I, Careaga D, Arock M, Tejdor L, Velly L. Monocyte distribution width (MDW) performance as

- an early sepsis indicator in the emergency department: comparison with CRP and procalcitonin in a multicenter international European prospective study. *Crit Care*. 2021; 25 (1): 227. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03622-5>.
14. Bègue L, Schlund M, Raoul G, Ferri J, Lauwers L, Nicot R. Biological factors predicting the length of hospital stay in odontogenic cellulitis. *Journal of Stomatology oral and Maxillofacial Surgery*. 2021; 123 (3): 303–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jomas.2021.07.007>.
  15. Novikova IS, Gulenko OV, Gerbova TV. Ocenka urovnej ferritina i C-reaktivnogo belka u pacientov s odontogennymi flegmonami cheljustno-licevoj oblasti. *Operativnaja hirurgija i klinicheskaja anatomija (Pirogovskij nauchnyj zhurnal)*. 2024; 8 (4): 49–54. Available from: <https://doi.org/10.17116/operhirurg2024804149>. Russian.
  16. Weise H, Naros A, Weise C. Severe odontogenic infections with septic progress — a constant and increasing challenge: a retrospective analysis. *BMC Oral Health Journal*. 2019; 19 (1): 173. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0866-6>.
  17. Dave M, Barry S, Coulthard P. An evaluation of sepsis in dentistry. *British Dental Journal*. 2021; 230 (6): 351–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41415-021-2724-6>.
  18. Kim J-K, Lee J-H. Clinical utility of procalcitonin in severe odontogenic maxillofacial infection. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery Journal*. 2021; 43 (1): 3. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40902-020-00288-x>.

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОГРАММНО-АППАРАТНОГО КОМПЛЕКСА АНАЛИЗА ФЕНОМЕНА САМОИДЕНТИФИКАЦИИ ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА

В. Б. Никишина<sup>1</sup>, Е. А. Петраш<sup>1</sup>✉, А. С. Чаусов<sup>1</sup>, К. К. Каниметов<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Нейрологопедический центр «Выше радуги», Москва, Россия

Актуальность предлагаемого исследования обусловлена необходимостью поиска объективизирующих методов оценки феномена самоидентификации детей раннего возраста. Целью исследования было оценить диагностический потенциал программно-аппаратного комплекса анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста. Объем выборки составил 136 испытуемых раннего возраста (12–36 месяцев) — 57 мальчиков и 79 девочек. Методы исследования: функциональные нейропсихологические пробы оценки лицевого и оптико-пространственного гнозиса; проба 22 — Mirror image series когнитивной шкалы Bayley-III; Self-recognition mirror test; разработанный программно-аппаратный комплекс анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста (ПАК). В результате проведенного исследования установлено, что самоидентификация появляется в возрасте 18 месяцев, что также подтверждено ранее проведенными исследованиями. Однако реакция на свое отражение в зеркале как одно из проявлений самоидентификации наблюдается у детей в более раннем возрасте и к 12 месяцам оказывается уже сформированной у части детей, на что указывают наличие успешных выполнений пробы в группе 12–17 месяцев и низкая специфичность методики для самоидентификации. Таким образом, на основании полученных результатов исследования зафиксирована высокая специфичность к самоидентификации детей раннего возраста ПАК.

**Ключевые слова:** ранний возраст, самоидентификация, программно-аппаратный комплекс

**Вклад авторов:** вклад авторов в исследование равнозначный

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 240 от 20 мая 2024 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на обследование.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Анатольевна Петраш  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; petrash@mail.ru

**Статья получена:** 28.03.2025 **Статья принята к печати:** 14.04.2025 **Опубликована онлайн:** 25.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.021

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## DIAGNOSTIC POTENTIAL OF THE SOFTWARE-HARDWARE COMPLEX FOR ANALYSIS OF SELF-IDENTIFICATION PHENOMENON IN EARLY CHILDHOOD

Nikishina VB<sup>1</sup>, Petrash EA<sup>1</sup>✉, Chausov AS<sup>1</sup>, Kanimetov KK<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Neuro Speech Therapy Center "Above the Rainbow", Moscow, Russia

The relevance of the study provided results from the need to search for the objectifying methods to assess self-identification phenomenon in early childhood. The study aimed to evaluate the diagnostic potential of the software-hardware complex for analysis of self-identification phenomenon in young children. The sample consisted of 136 subjects of early age (12–36 months): 57 boys and 79 girls. Assessment methods: functional neuropsychological tests for evaluation of facial and optical-spatial gnosia; test 22 — mirror image series of the Bayley-III cognitive scale; self-recognition mirror test; the developed software-hardware complex for analysis of self-identification phenomenon in early childhood (SHC). The study conducted has shown that self-identification emerges at the age of 18 months, which has been also confirmed by the earlier research. However, the response to one's own reflection in the mirror as one sign of self-identification manifests itself in children at an earlier age and in some children turns out to be shaped by the age of 12 months, which is suggested by the facts of successful test execution in the group aged 12–17 months and low specificity of the method for self-identification. Thus, high SHC specificity for self-identification in early childhood is reported based on the findings.

**Keywords:** early age, self-identification, software-hardware complex

**Author contribution:** the authors contributed to the study equally.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 240 dated 20 May 2024); the informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Petrash  
Ostrovityanov, 1, Moscow, 117997, Russia; petrash@mail.ru

**Received:** 28.03.2025 **Accepted:** 14.04.2025 **Published online:** 25.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.021

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

В современной психологической науке существует проблема измеряемости и точности измерения сложных психических феноменов раннего этапа манифестации. Оценку психического развития в раннем возрасте в настоящее время осуществляют с использованием методов наблюдения и шкалирования, что характеризуется высокой субъективностью. Для оценки самоидентификации в

более старшем возрасте используют следующие виды оборудования: разные виды логопедических зеркал, в работе с которыми требуется не только находить части лица, но и корректно выполнять действия артикуляционного аппарата; технология Sondsorry, согласно которой после прослушивания музыки необходимо точное повторение движений; комплекс Тимоссо, с помощью которого

происходит управление движениями персонажа за счет собственных (через камеру).

За последнее десятилетие (2014–2023 гг.) технологии искусственного интеллекта и машинного обучения получили колоссальное развитие. С каждым годом спектр решаемых с их помощью задач все больше растет. Сегодняшний уровень развития технологии искусственного интеллекта позволяет использовать аппаратные решения для работы над сложными диагностическими проблемами [1].

Пионером в исследованиях самоидентификации человека был В. Amsterdam, опубликовавший свой эксперимент с использованием Self-recognition mirror test, модификации Mark test (разработанного для экспериментов с приматами Gordon G. Gallup в 1970 г. [2]), направленной на выявление самоидентификации человека, на младенцах в 1972 г. Автором было обнаружено, что дети начинают идентифицировать отражение в зеркале как репрезентацию своего тела с 1,5–2 лет [3]. Многие дальнейшие исследования были нацелены на разработку проблемы самоидентификации детей раннего возраста и ассоциированы со следующими именами: А. Aron, В. Fraley [4], В. I. Bertenthal, К. W. Fischer [5], D. Bischof-Köhler [6], T. Broesch [7], S. Duval, R. A. Wicklund [8], K. Guise [9], J. Kärtner [10], J. P. Keenan [11], M. Lewis [12], K. Musholt [13], P. Rochat [14], S. Savanah [15].

В 1977 г. было показано, что лица с умственной отсталостью не всегда успешно выполняют Self-recognition mirror test [16]. В дальнейшем целый ряд ученых [17–19] занимались исследованиями самоидентификации при различных нозологиях, таких как шизотипическое расстройство личности, болезнь Альцгеймера, синдром Дауна, аутизм, шизофрения и синдром расщепленного мозга.

С 1999 по 2001 г. был проведен ряд исследований, направленных на выявление нейробиологических коррелятов самоидентификации человека, которые свидетельствовали о правополушарной локализации самоидентификации у человека [20]. В 1999 г. [21] и в 2005 г. [22] на пациентах с локальным повреждением головного мозга в правой префронтальной коре показано, что такие пациенты не способны идентифицировать отражение в зеркале как свое при сохранном узнавании лиц других людей, в том числе при использовании зеркала. Одними из ведущих исследователей, раскрывающих современный взгляд на структуру мозгового субстрата самоидентификации, является van S. J. Veuiw и S. A. Chance, которые в 2014 г. при помощи фМРТ выявили структуру активации коры головного мозга при самоидентификации. По результатам эксперимента они заключили, что наибольшее значение имеют префронтальная кора и височно-теменные тракты [23].

Таким образом, в результате историко-перспективного анализа методов изучения феномена самоидентификации установлено, что Mark test и его модификацию Self-recognition mirror test применяют для выявления нейробиологических маркеров самоидентификации животных и людей, в том числе в клинических исследованиях. Условия проведения теста варьируются в зависимости от задачи, глобально их можно разделить на три вида: эксперимент без дополнительного вмешательства (применяют при исследовании людей, знакомых с зеркалом); эксперимент со спонтанным обучением взаимодействию с зеркалом (применяют для всех видов животных); эксперимент с контролируемым обучением взаимодействию с зеркалом (применяют к большинству животных, за исключением некоторых видов приматов).

Одним из факторов формирования самоидентификации детей раннего возраста является желание взаимодействовать со своим отражением — изучать его, улыбаться ему, играть с ним. Такая положительная реакция на свое отражение присутствует как у детей, не обладающих еще в силу возраста самоидентификацией, так и у детей, у которых уже появилась (сформировалась) самоидентификация [24; 25].

В качестве методологического основания представляемого исследования выступает концепция Johannes L. Brandl, согласно которой нейрокогнитивные маркеры самоидентификации определяют как нейрокогнитивные функции, обеспечивающие самоидентификацию ребенка [26]. Самоидентификация в зеркале осуществляется, с одной стороны, на основе знания о том, как выглядит твое лицо, с другой стороны — на основе интеграции проприоцептивных и экстероцептивных ощущений с визуальной информацией. Это позволяет соотносить видимое отражение со своими движениями и определить себя как источник этих движений. Активация коры головного мозга в зонах, ответственных за лицевой гнозис, происходящая при решении задач на самоидентификацию, также подтверждает значимую роль в формировании самоидентификации распознавания своего лица в зеркальном отражении [23]. Таким образом, в качестве нейрокогнитивных маркеров самоидентификации выступают следующие: позитивная реакция на отражение; проприоцептивный и экстероцептивный гнозис; зрительный гнозис (лицевой, симультанный, оптико-пространственный).

Концептуально наши рассуждения основаны на концепции психического онтогенеза. В соответствии с онтогенетическими закономерностями инициация процесса самоидентификации начинается с появления комплекса оживления, являющегося новообразованием младенчества (в возрасте 2,5–3 месяцев) и характеризующегося появлением вокализации, моторной активности и улыбки при виде значимого взрослого (матери или отца). Далее, в возрасте 7–8 месяцев происходит дифференциация лица других людей в границах «свой–чужой». К возрасту 18 месяцев ребенок начинает дифференцировать свое лицо от лица другого человека (рис. 1).

Разработка программно-аппаратного комплекса (ПАК) позволит объективизировать процедуру оценки уровня психического развития детей в раннем возрасте (1–3 года), а также сформировать систему измеряемых критериев.

Цель исследования — оценить диагностический потенциал программно-аппаратного комплекса анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Общий объем выборки составил 136 человек (57 (42%) мальчиков и 79 (58%) девочек), средний возраст —  $25,35 \pm 10,38$  месяцев. Выборку формировали в соответствии с выделенными нами критериями включения и исключения. Критерии включения: возраст 1–3 года; женский и мужской пол; нормотипичное когнитивное развитие в соответствии с возрастом. Критерии исключения: возраст младше 1 года и старше 3 лет; отклонение от возрастных норм когнитивного развития; наличие тяжелой соматической патологии в стадии декомпенсации; нарушения слуха и зрения.

На основании критических для самоидентификации возрастных периодов [3] были сформированы три

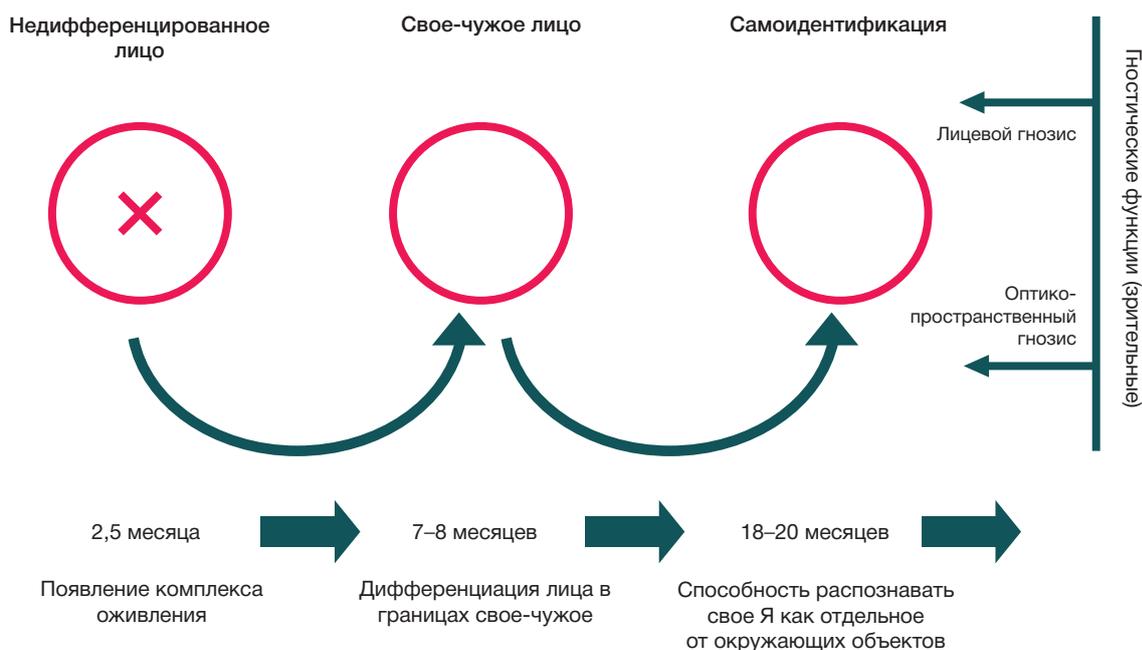


Рис. 1. Схема концептуальных рассуждений онтогенетического развития феномена самоидентификации детей раннего возраста

исследовательские группы: дети 12–17 месяцев, дети 18–23 месяцев и дети старше 24 месяцев.

Исследование проводили на базе НИКИ педиатрии и детской хирургии имени академика Ю. Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения России, РДКБ — филиал ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения России и ГБУЗ Московской области «ДКЦ имени Л. М. Рошалья». Время обследования одного испытуемого составляло 20–35 мин.

Исследование проводили в два этапа. Задача первого этапа — оценка лицевого гнозиса у детей раннего возраста с использованием функциональных нейропсихологических проб. Ребенок располагается напротив экспериментатора (в большинстве случаев — у мамы на коленях). Экспериментатор привлекает внимание ребенка, представляется и предлагает ребенку поиграть, после чего просит: «Покажи, где твой носик» (или другая часть лица). Для второй пробы все происходит аналогичным образом, но с просьбой показать части лица законного представителя. Для выполнения третьей пробы экспериментатор просит законного представителя показать фотографии родственников (мамы, папы, бабушки, дедушки, брата/сестры) и спросить у ребенка, кто изображен на фотографии. Оценка лицевого гнозиса проводили по критериям темпа, точности и дифференцированности по шкале Ж. М. Глозман: верное указание испытуемым частей своего лица по речевой инструкции; верное указание испытуемым частей лица другого человека по речевой инструкции; узнавание лица родственника по фотографии.

Задачей второго этапа было оценить самоидентификацию детей раннего возраста с использованием: пробы 22 — Mirror image series когнитивной шкалы Bayley-III — серия зеркальных отражений [27]; Self-recognition mirror test (SMT) [3]; разработанного программно-аппаратного комплекса анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста (ПАК) [28].

Процедуру исследования при помощи пробы Bayley-III производят следующим образом: испытуемому на расстоянии 20–25 см от лица демонстрируют зеркало,

размером 15 × 21 см, оценивают реакцию ребенка на отражение. Положительную оценку ставят в случае, если ребенок заинтересован отражением, изучает его, улыбается и весело реагирует.

Процедура Self-recognition mirror test заключается в нанесении законным представителем испытуемому на нос метки при помощи яркой косметики и дальнейшей регистрации поведения испытуемого при предъявлении зеркала. Тест считается пройденным при попытках испытуемого дотронуться или стереть метку со своего лица, а также при употреблении личного местоимения или назывании своего имени при вопросе «Кто это?» с указанием на зеркало. Продолжительность теста: 10 мин, каждые 2 мин 30 с экспериментатор просит законного представителя привлечь внимание испытуемого к зеркалу словами: «Смотри! Смотри! Смотри! Кто это?».

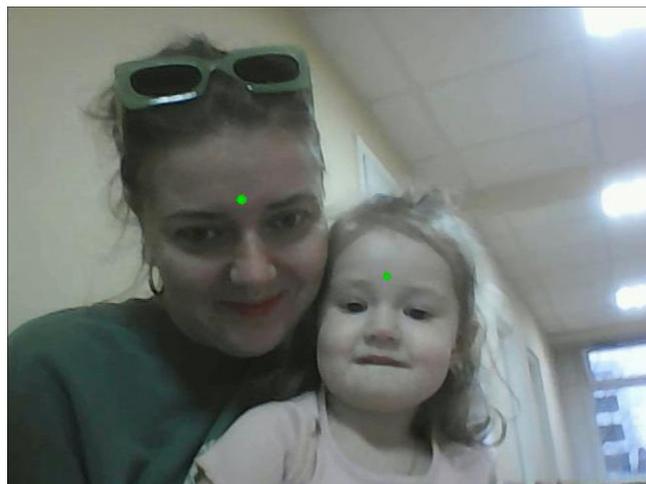
Процедура исследования с помощью разработанного ПАК следующая: испытуемый располагается напротив экрана и видеокамеры на расстоянии 40–60 см без дополнительных инструкций. На экране выводят изображение, полученное с помощью видеокамеры, с нарисованными метками на лицах (рис. 2).

В случае, если ребенок отвлекается, следует обратить его внимание на экран фразой: «Смотри!». При отсутствии реакции испытуемого на метку в течение 20 с меняют размер метки, а затем, по достижении максимального размера, ее цвет. При наличии реакции на метку или предъявлении всех вариантов цветов и размеров, положение метки меняют на следующее. Порядок предъявления меток осуществляют следующим образом: зеленая (сначала 2–4 мм, затем 6–8 мм, затем 9–12 мм); синяя (также по мере увеличения размера); красная также по мере увеличения размера. Последовательно метки предъявляют в следующем порядке расположения: лоб, нос, подбородок (рис. 3).

Оценку диагностического потенциала программно-аппаратной технологии компьютерного зрения в анализе феномена самоидентификации детей раннего возраста осуществляли по критериям чувствительности и специфичности. Чувствительность программно-аппаратной технологии характеризует точность диагностической



Изображение, полученное с помощью видеокамеры в ходе обследования (35 месяцев)



Изображение, выводимое на экране в ходе обследования (35 месяцев)

Рис. 2. Пример изображения, полученный с помощью ПАК

методики, с которой программа верно определяет наличие исследуемого феномена и определяет устойчивость к ошибкам первого рода (доля положительных результатов, определенных диагностической методикой как положительные, из общего объема полученных результатов). Специфичность характеризует точность диагностической методики в регистрации исследуемого признака (устойчивость к ошибкам второго рода) и отражает долю негативных результатов, определенных диагностической методикой как отрицательные (в общем объеме полученных результатов).

#### Обработка и интерпретация полученных результатов эмпирического исследования

Количественную обработку данных проводили с помощью методов описательной и корреляционной статистики (коэффициент корреляции Спирмена), а также метода факторного анализа с varimax-вращением ( $p < 0,05$ ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке результатов выполнения функциональных нейропсихологических проб диагностики лицевого и оптико-пространственного гнозиса установлено, что у детей в возрасте до 18 месяцев фиксируются низкие показатели темпа, точности и дифференцированности по всем предложенным пробам.

На основании полученных результатов выявлены возрастные особенности, позволяющие проследить процесс развития сложных видов зрительного гнозиса в раннем возрасте. Установлена следующая последовательность этапов: в возрасте 16 месяцев формируется процесс узнавания частей лица другого человека (по речевой инструкции), что связано с активным развитием номинативной функции речи; далее к 18 месяцам развивается оптико-пространственный гнозис в части узнавания взаимно расположенных частей лица на картинке со схематичным изображением. Также, в

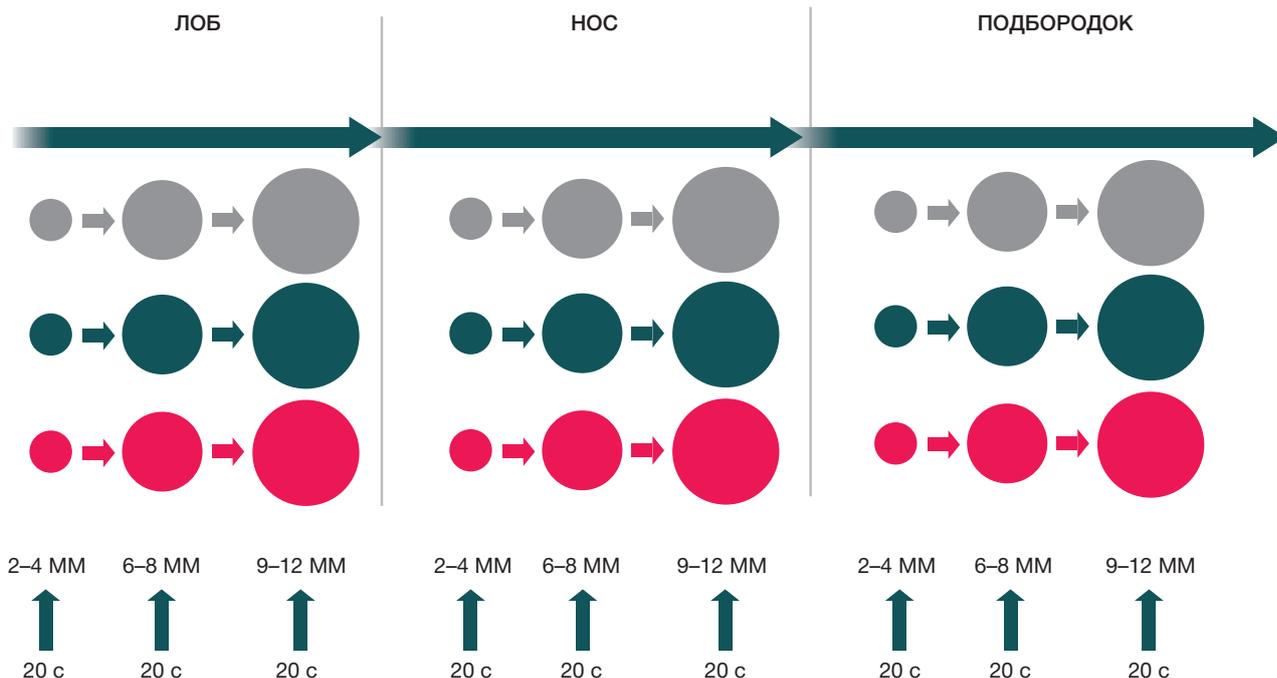


Рис. 3. Схема предъявления меток в процедуре исследования феномена самоидентификации детей раннего возраста с использованием ПАК

Таблица 1. Результаты корреляционного анализа серии зеркальных отражений, SMT и проб ПАК в разных возрастных группах с помощью критерия Спирмена

Сравниваемые показатели	Возрастные группы (месяцы)			
	12–17	18–23	24+	Всего
SMT и ПАК с меткой на лбу	–	0,43	0,43	0,52**
SMT и ПАК с меткой на носу	–	0,68*	0,43	0,59**
SMT и ПАК с меткой на подбородке	–	0,68*	0,50*	0,66**
SMT и ПАК	–	0,68*	0,50*	0,66**
SMT и Bayley-III	–	0,62	0,68**	0,64**
ПАК с меткой на лбу и ПАК с меткой на носу	–	0,62	0,58**	0,63**
ПАК с меткой на лбу и ПАК с меткой на подбородке	–	0,62	0,82**	0,79**
ПАК с меткой на носу и ПАК с меткой на подбородке	–	1**	0,82**	0,89**
Bayley-III и ПАК с меткой на лбу	–	0,25	0,27	0,33*
Bayley-III и ПАК с меткой на носу	–	0,41	0,27	0,38*
Bayley-III и ПАК с меткой на подбородке	–	0,41	0,33	0,42**
Bayley-III и ПАК	–	0,41	0,33	0,42**

Примечание: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ .

границах 16–18 месяцев происходит формирование узнавания частей своего лица по речевой инструкции. В возрасте 18–22 месяцев становится возможным (онтогенетически доступным) расположение деталей схематичного изображения лица в границах его овала относительно друг друга. Это, в свою очередь, позволяет узнавать лица сначала близких и хорошо знакомых людей, а затем дифференцировать лица незнакомых (или мало знакомых) людей как в реальности, так и по изображению — схематичному либо реалистичному. По критериям темпа, точности и дифференцированности в онтогенетическом аспекте сначала формируются темповые характеристики, затем показатели дифференцированности, а далее — точности.

Анализ самоидентификации детей раннего возраста осуществляли с помощью следующих методик: Self-recognition mirror test; проба 22. Mirror image series когнитивной шкалы Bayley-III; ПАК. Применение обозначенных инструментов предполагает качественную оценку результата по критерию выполнения (идентифицировал — не идентифицировал). В результате было установлено, что процент успешного выполнения всех тестов самоидентификации возрастает по мере увеличения возраста — успешное выполнение Self-recognition mirror test и ПАК доступно детям с 18 месяцев.

Далее осуществляли оценку внешней валидности предлагаемого ПАК, которая включала в себя два этапа. Первым этапом проводили оценку по критериям чувствительности и специфичности. В качестве эталонных положительных и отрицательных значений нами были определены результаты методики Self-recognition mirror test, а в качестве сравниваемых оценочных методик — проба 22. Mirror image series когнитивной шкалы Bayley-III и ПАК. Фиксируется высокая специфичность ПАК в задаче анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста с возрастанием чувствительности от пробы с меткой на лбу (45,45%) к пробе с меткой на носу (54,55%) и от пробы с меткой на носу к пробе с меткой на подбородке (63,64%). Максимальная чувствительность ПАК в целом фиксируется в возрастной группе 18–23 месяца, однако проба с меткой на лбу показывает наибольшую чувствительность для старшей группы

(24+ месяца). Чувствительность ПАК в возрастной группе до 18 месяцев оценить невозможно в связи с отсутствием успешных выполнений SMT в этом возрасте.

Вторым этапом осуществляли оценку согласованности показателей исследования самоидентификации детей раннего возраста, полученных при помощи методик SMT, ПАК и серии зеркальных отражений. В табл. 2 представлены результаты попарного корреляционного анализа вышеуказанных методик с использованием критерия ранговой корреляции Спирмена. При анализе результатов ПАК отдельно исследовали каждую пробу (с нанесением метки на разные части лица) и показатель выполнения хотя бы одной из трех проб в ходе исследования испытуемого.

В возрастной группе 18–23 месяца выявлены статистически значимые корреляции SMT с пробами ПАК с меткой на носу и подбородке, а также с показателем успешного выполнения как минимум одной пробы ( $p < 0,05$ ). Помимо этого, наблюдается полная согласованность результатов проб ПАК с меткой на носу и подбородке ( $p < 0,01$ ). В возрастной группе старше 24 месяцев наблюдаются значимые корреляции результатов SMT с пробой ПАК с меткой на подбородке и показателем успешного выполнения как минимум одной пробы ( $p < 0,05$ ). Помимо этого, значимые корреляции обнаруживаются между всеми пробами ПАК и между SMT и пробой шкалы Bayley-III ( $p < 0,01$ ). При анализе всей выборки наблюдаются значимые корреляции всех исследуемых параметров. Наиболее высокие коэффициенты корреляции обнаружены между SMT и пробой ПАК с меткой на подбородке, показателем успешного выполнения как минимум одной пробы и пробой шкалы Bayley-III, а также между пробами ПАК.

Для оценки нейрокогнитивных маркеров самоидентификации у детей раннего возраста проводили процедуру факторного анализа с varimax-вращением по результатам оценки лицевого и оптико-пространственного гнозиса и самоидентификации детей раннего возраста, а также показателей самоидентификации, полученных с помощью серии зеркальных отражений, SMT и ПАК. Критерии были отобраны по критерию Кайзера, для снижения числа пересекающихся факторов по исследуемым переменным; нами было применено ортогональное разложение с методом вращения Varimax.

Таблица 2. Результаты факторного анализа лицевого гнозиса и самоидентификации детей раннего возраста

Переменная		Фактор 1	Фактор 2	Фактор 3
Указание части своего лица по речевой инструкции	Темп	0,89	0,33	0,24
	Точность	0,91	0,25	0,23
	Дифференцированность	0,91	0,25	0,23
Указание части лица другого человека по речевой инструкции	Темп	0,82	0,19	0,46
	Точность	0,82	0,17	0,48
	Дифференцированность	0,81	0,2	0,44
Узнавание фотографии родственника	Темп	0,57	0,1	0,82
	Точность	0,57	0,1	0,82
	Дифференцированность	0,57	0,1	0,82
Bayley-III		0,17	0,34	0,83
Self-recognition mirror test		0,41	0,64	0,28
ПАК с меткой на лице		0,13	0,84	0,09
ПАК с меткой на носу		0,16	0,89	0,11
ПАК с меткой на подбородке		0,19	0,95	0,12
ПАК		0,19	0,95	0,12

Принадлежность переменной к фактору определяли по значению веса  $\geq 0,4$ . Результаты факторного анализа представлены в табл. 2.

В результате факторного анализа показателей лицевого и оптико-пространственного гнозиса и методики анализа самоидентификации детей раннего возраста нами было выделено три фактора. Фактор 1: указание части своего лица по речевой инструкции — 0,9 (среднее арифметическое между критериями оценки); указание части лица другого человека по речевой инструкции — 0,817 (среднее арифметическое между критериями оценки); узнавание фотографии родственника — 0,56 (среднее арифметическое между критериями оценки); Self-recognition mirror test — 0,41. Фактор 2: показатель успешного выполнения как минимум одной пробы ПАК — 0,95; пробы ПАК: с меткой на лице — 0,82; с меткой на носу — 0,89; с меткой на подбородке — 0,95; Self-recognition mirror test: 0,64. Фактор 3: проба шкалы Bayley-III — 0,83; узнавание родственника по фотографии — 0,8 (среднее арифметическое между критериями оценки); указание части лица другого человека по речевой инструкции — 0,46 (среднее арифметическое между критериями оценки). Опираясь на выделенные факторы, можем сделать вывод о большей взаимосвязи результатов Self-recognition mirror test с результатами ПАК, чем с результатами пробы шкалы Bayley-III и проб оценки лицевого гнозиса.

Исследование согласованности переменных внутри факторов осуществлялось с использованием коэффициента альфа Кронбаха и показало высокие коэффициенты согласованности: по фактору 1  $\alpha = 0,97$ ; по фактору 2  $\alpha = 0,93$ ; по фактору 3  $\alpha = 0,97$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Самоидентификация появляется в возрасте 18 месяцев, что подтверждается как более ранними исследованиями [3], так и результатами проведенного исследования, в рамках которого не было выявлено ни одного случая успешного прохождения тестов самоидентификации в группе 12–17 месяцев. В то же время реакция на свое отражение в зеркале, регистрируемая с помощью серии зеркальных отражений, проявляется у детей в более раннем возрасте и к 12 месяцам оказывается уже сформированной у части детей, на что указывают наличие

успешных выполнений пробы в группе 12–17 месяцев и низкая специфичность методики для самоидентификации. В совокупности с высокой чувствительностью и наличием значимых корреляций по результатам оценки внешней валидности (с использованием пробы из шкалы Bayley-III и Self-recognition mirror test) для группы старше 24 месяцев и всей выборки в целом, можно сделать вывод о том, что заинтересованность в своем отражении, изучение его и позитивная реакция являются нейрокогнитивным маркером самоидентификации детей раннего возраста.

## ВЫВОДЫ

Программно-аппаратный комплекс анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста обладает высокой специфичностью к самоидентификации детей раннего возраста, в то же время чувствительность метода не обладает столь высокими значениями. Мы предполагаем, что на чувствительность оказывают влияние характеристики метки и ее реалистичность. В полученных данных наблюдается возрастание чувствительности и корреляции с Self-recognition mirror test от первой предъявленной пробы к последней, а также наличие значимых корреляций для всех возрастных групп между двумя последними пробами ПАК, что может быть следствием эффекта последовательности. Факторный анализ выявил принадлежность результатов Self-recognition mirror test к двум факторам: фактору преимущественного ассоциирования с лицезым гнозисом; фактору преимущественного ассоциирования с ПАК. При этом результаты Self-recognition mirror test оказываются наиболее значимыми для второго фактора, что подтверждает взаимосвязь между результатами ПАК и Self-recognition mirror test. Принадлежность результатов Self-recognition mirror test к первому фактору подтверждает значимость лицевого гнозиса для самоидентификации детей раннего возраста. Исходя из этого, в качестве потенциала дальнейших исследований с использованием разработанного ПАК рассматривается исследование влияния изменения цвета, формы метки, компьютерных алгоритмов позиционирования метки относительно лица испытуемого и использования реалистичных изображений в качестве метки на чувствительность ПАК и исследование влияния последовательности и положения метки на лице испытуемого на успешность выполнения теста.

## Литература

- Niilo V. Valtakari, Roy S. Hessels, Diederick C. Niehorster, Charlotte Viktorsson, Pär Nyström, Terje Falck-Ytter, Chantal Kemner, Ignace T.C. Hooge A field test of computer-vision-based gaze estimation in psychology. *Behavior Research Methods*. 2023; p. 1900–15.
- Gallup GG. Chimpanzees: self-recognition. *Science*. 1970; p. 86–87.
- Amsterdam B. Mirror self-image reactions before age two. *Dev Psychobiol*. 1972; p. 297–305.
- Aron A, Fraley B. Relationship closeness as including other in the self: cognitive underpinnings and measures. *Soc Cognit*. 1999; p. 140–160
- Bertenthal BI, Fischer KW. Development of self-recognition in the infant. *Developmental Psychology*. 1978; p. 44–50.
- Bischof-Köhler D. Empathy and self-recognition in phylogenetic and ontogenetic perspective. *Emotion Review*. 2012; p. 40–48.
- Broesch T, Callaghan T, Henrich J, Murphy C, Rochat P. Cultural variations in children's mirror self-recognition. *Journal of Cross Cultural Psychology*. 2010; p. 1–13.
- Duval S, Wicklund RA. A theory of objective self-awareness. New York: Academic Press, 1972; 238 p.
- Guise K, Kelly K, Romanowski J, Vozeley K, Platek SM, Murray E, et al. The anatomical and evolutionary relationship between self-awareness and theory of mind. *Human Nature*. 2007; p. 132–142.
- Kärtner J, Keller H, Chaudhary N, Yovski RD. The development of mirror self-recognition in difference sociocultural contexts. *Monographs of the Society for Research in Child Development*. 2012; 316 p.
- Keenan J, Gallup GG, Falk D. The face in the mirror: The search for the origin of consciousness. New York: Harper Collins. 2003; 304 p.
- Lewis M. The origins and uses of self-awareness or the mental representation of me. *Consciousness and Cognition*. 2011; p. 120–129.
- Musholt K. Thinking about oneself. The MIT Press. 2015; 232 p.
- Rochat P. Self-recognition roots of human normativity // *Phenomenology and the Cognitive Sciences*. 2015; p. 741–753.
- Savanah S. Mirror self-recognition and symbol-mindedness // *Biology and philosophy*. 2012; p. 657–673.
- Harris LP. Self-recognition among institutionalized profoundly retarded males: A replication. *Bulletin of the Psychonomic Society*. 1977; p. 43–44.
- Gallup GG, Anderson JR, Platek SM. Self-awareness, social intelligence and schizophrenia. *The self in neuroscience and psychiatry*. Cambridge UK: Cambridge University Press. 2003; p. 147–165.
- Barnacz A, Johnson A, Constantino P, Keenan JP. Schizotypal personality traits and deception: The role of self-awareness. *Schizophrenia Research*. 2004; p. 115–116.
- Cunningham C, Glenn S. Self-awareness in young adults with Down syndrome: I. Awareness of Down syndrome and disability. *International Journal of Disability, Development and Education*. 2004; p. 335–361.
- Keenan JP, et al. Hand response differences in a self-identification task // *Neuropsychologia*. 2000; p. 1047–1053.
- Breen N. Misinterpreting the mirrored self // Paper presented at the Association for the Scientific Study of Consciousness, London, Ontario. 1999; p. 239–54.
- Sherer M, Hart T, Whyte J, Nick TG, Yablon SA. Neuroanatomic basis of impaired self-awareness after traumatic brain injury: Findings from early computed tomography. *Journal of Head Trauma and Rehabilitation*. 2005; p. 287–300.
- van Veluw SJ, Chance SA. Differentiating between self and others: An ALE meta-analysis of fMRI studies of self-recognition and theory of mind. *Brain Imaging and Behavior*. 2014; p. 24–38.
- Dimaggio G, Lysaker PH, Carcione A, Nicolo G, Semerari A. Know yourself and you shall know the other . . . to a certain extent: Multiple paths of influence of self-reflection on mindreading. *Consciousness and Cognition*. 2008; p. 778–789.
- Nielsen M, Dissanayake C. Pretend play, mirror self-recognition and imitation: A longitudinal investigation through the second year. *Infant Behavior and Development*. 2004; p. 342–365.
- Brandl J. The puzzle of mirror self-recognition. *Phenomenology and the Cognitive Sciences*. 2016; p. 279–304.
- Bayley N. Bayley scales of infant and toddler development. 3 изд. Harcourt Assessment Inc., 2006.
- Никишина В. Б., Чаусов А. С. Программный комплекс анализа феномена самоидентификации детей раннего возраста. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2025611073, 16.01.2025.

## References

- Niilo V. Valtakari, Roy S. Hessels, Diederick C. Niehorster, Charlotte Viktorsson, Pär Nyström, Terje Falck-Ytter, Chantal Kemner, Ignace T.C. Hooge A field test of computer-vision-based gaze estimation in psychology. *Behavior Research Methods*. 2023; p. 1900–15.
- Gallup GG. Chimpanzees: self-recognition. *Science*. 1970; p. 86–87.
- Amsterdam B. Mirror self-image reactions before age two. *Dev Psychobiol*. 1972; p. 297–305.
- Aron A, Fraley B. Relationship closeness as including other in the self: cognitive underpinnings and measures. *Soc Cognit*. 1999; p. 140–160
- Bertenthal BI, Fischer KW. Development of self-recognition in the infant. *Developmental Psychology*. 1978; p. 44–50.
- Bischof-Köhler D. Empathy and self-recognition in phylogenetic and ontogenetic perspective. *Emotion Review*. 2012; p. 40–48.
- Broesch T, Callaghan T, Henrich J, Murphy C, Rochat P. Cultural variations in children's mirror self-recognition. *Journal of Cross Cultural Psychology*. 2010; p. 1–13.
- Duval S, Wicklund RA. A theory of objective self-awareness. New York: Academic Press, 1972; 238 p.
- Guise K, Kelly K, Romanowski J, Vozeley K, Platek SM, Murray E, et al. The anatomical and evolutionary relationship between self-awareness and theory of mind. *Human Nature*. 2007; p. 132–142.
- Kärtner J, Keller H, Chaudhary N, Yovski RD. The development of mirror self-recognition in difference sociocultural contexts. *Monographs of the Society for Research in Child Development*. 2012; 316 p.
- Keenan J, Gallup GG, Falk D. The face in the mirror: The search for the origin of consciousness. New York: Harper Collins. 2003; 304 p.
- Lewis M. The origins and uses of self-awareness or the mental representation of me. *Consciousness and Cognition*. 2011; p. 120–129.
- Musholt K. Thinking about oneself. The MIT Press. 2015; 232 p.
- Rochat P. Self-recognition roots of human normativity // *Phenomenology and the Cognitive Sciences*. 2015; p. 741–753.
- Savanah S. Mirror self-recognition and symbol-mindedness // *Biology and philosophy*. 2012; p. 657–673.
- Harris LP. Self-recognition among institutionalized profoundly retarded males: A replication. *Bulletin of the Psychonomic Society*. 1977; p. 43–44.
- Gallup GG, Anderson JR, Platek SM. Self-awareness, social intelligence and schizophrenia. *The self in neuroscience and psychiatry*. Cambridge UK: Cambridge University Press. 2003; p. 147–165.
- Barnacz A, Johnson A, Constantino P, Keenan JP. Schizotypal personality traits and deception: The role of self-awareness. *Schizophrenia Research*. 2004; p. 115–116.
- Cunningham C, Glenn S. Self-awareness in young adults with Down syndrome: I. Awareness of Down syndrome and disability. *International Journal of Disability, Development and Education*. 2004; p. 335–361.
- Keenan JP, et al. Hand response differences in a self-identification task // *Neuropsychologia*. 2000; p. 1047–1053.
- Breen N. Misinterpreting the mirrored self // Paper presented

- at the Association for the Scientific Study of Consciousness, London, Ontario. 1999; p. 239–54.
22. Sherer M, Hart T, Whyte J, Nick TG, Yablon SA. Neuroanatomic basis of impaired self-awareness after traumatic brain injury: Findings from early computed tomography. *Journal of Head Trauma and Rehabilitation*. 2005; p. 287–300.
  23. van Veluw SJ, Chance SA. Differentiating between self and others: An ALE meta-analysis of fMRI studies of self-recognition and theory of mind. *Brain Imaging and Behavior*. 2014; p. 24–38.
  24. Dimaggio G, Lysaker PH, Carcione A, Nicolo G, Semerari A. Know yourself and you shall know the other . . . to a certain extent: Multiple paths of influence of self-reflection on mindreading. *Consciousness and Cognition*. 2008; p. 778–789.
  25. Nielsen M, Dissanayake C. Pretend play, mirror self-recognition and imitation: A longitudinal investigation through the second year. *Infant Behavior and Development*. 2004; p. 342–365.
  26. Brandl J. The puzzle of mirror self-recognition. *Phenomenology and the Cognitive Sciences*. 2016; p. 279–304.
  27. Bayley N. Bayley scales of infant and toddler development. 3 изд. Harcourt Assessment Inc., 2006.
  28. Nikishina VB, Chausov AS. Programmnyj kompleks analiza fenomena samoidentifikacii detej rannego vozrasta. Svidetel'stvo o registracii programmy dlja JeVM RU 2025611073, 16.01.2025. Russian.

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ СПЕРМАТОЗОИДА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ПОМОЩИ КОНФОКАЛЬНОЙ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Р. В. Назаренко<sup>1</sup>✉, А. В. Иржак<sup>2</sup>, Б. Р. Гвасалия<sup>3</sup>, Д. Ю. Пушкар<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ООО «Клиника профессора Здановского», Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов, Российской академии наук, Черноголовка, Россия

<sup>3</sup> Российский университет медицины, Москва, Россия

Несмотря на широкое распространение методов исследования структуры и функциональной активности сперматозоидов, их практическое применение в программах экстракорпорального оплодотворения на сегодняшнем этапе достаточно ограничено. Прежде всего, ограничение связано с деструктивным характером методов. Целью работы было исследование возможности конфокальной рамановской спектроскопии в анализе биохимических маркеров клеточных органелл сперматозоида человека. Анализ 176 спектров сперматозоидов, полученных от здоровых доноров спермы в возрасте 18–35 лет, выполняли на конфокальном рамановском микроскопе Senterra фирмы Bruker (Германия). Спектры снимали с акросомы, ядра и шейки сперматозоида. Дополнительно суспензию сперматозоидов подвергали воздействию фокусированного пучка рентгеновского излучения. В результате были выделены пики, присущие ДНК ядра сперматозоида — 1092 см<sup>-1</sup> и 780 см<sup>-1</sup>, характерные для шейки — 748 см<sup>-1</sup> (маркер митохондриальной ДНК), для спектров с акросомы характерно изменение формы тройного пика 1420 см<sup>-1</sup>, 1445 см<sup>-1</sup> и 1486 см<sup>-1</sup> с преобладанием средней части в области 1445 см<sup>-1</sup>. Различий в основных рамановских пиках, присущих клеткам после повреждения ДНК при воздействии рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин, по сравнению с интактными образцами отмечено не было. Конфокальная рамановская спектроскопия является перспективным неинвазивным методом исследования ультраструктуры и биохимических процессов сперматозоида.

**Ключевые слова:** конфокальная рамановская спектроскопия, сперматозоид, фрагментация ДНК, биохимический профиль, метаболомика

**Вклад авторов:** Р. В. Назаренко — сбор и анализ данных, написание текста статьи; А. В. Иржак — сбор и анализ данных; Б. Р. Гвасалия, Д. Ю. Пушкар — редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» (протокол № 10 от 28 октября 2021 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Руслан Вадимович Назаренко  
nazrusvad@gmail.com

**Статья получена:** 22.02.2025 **Статья принята к печати:** 17.03.2025 **Опубликована онлайн:** 31.03.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.016

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE HUMAN SPERM CELL ORGANELLE BIOCHEMICAL MARKERS BY CONFOCAL RAMAN SPECTROSCOPY

Nazarenko RV<sup>1</sup>✉, Irzhak AV<sup>2</sup>, Gvasalia BR<sup>3</sup>, Pushkar DY<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Professor Zdanovsky Clinic LLC, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Microelectronics Technology and High Purity Materials of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

<sup>3</sup> Russian University of Medicine, Moscow, Russia

Despite widespread use of methods to assess structure and functional activity of spermatozoa, practical application of those in *in vitro* fertilization programs is currently rather limited. Limitations are primarily due to destructive nature of the methods. The study aimed to investigate the capabilities of confocal Raman spectroscopy in analysis of the human sperm organelle biochemical markers. Assessment of 176 spectra of spermatozoa collected from healthy sperm donors aged 18–35 years was performed using the Bruker Senterra confocal Raman microscope (Germany). Spectra were acquired from the sperm acrosome, nucleus, and midpiece. In addition, the spermatozoa suspension was exposed to a focused x-ray beam. As a result, bands were identified inherent to the sperm nuclear DNA — 1092 cm<sup>-1</sup> and 780 cm<sup>-1</sup>, typical for the head — 748 cm<sup>-1</sup> (mitochondrial DNA marker); changes of shape of the triple band 420 cm<sup>-1</sup>, 1445 cm<sup>-1</sup> and 1486 cm<sup>-1</sup> with predominance of the middle part 1445 cm<sup>-1</sup> are typical for acrosomal spectra. No differences in the main Raman bands inherent to cells post DNA damage under exposure to x-ray radiation for 5 and 10 min relative to intact samples were reported. Confocal Raman spectroscopy is a promising noninvasive method to assess sperm ultrastructure and biochemical processes.

**Keywords:** confocal Raman spectroscopy, sperm, DNA fragmentation, biochemical profile, metabolomics

**Author contribution:** Nazarenko RV — data acquisition and analysis, manuscript writing; Irzhak AV — data acquisition and analysis; Gvasalia BR, Pushkar DY — 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. 10 dated 28 October 2021).

✉ **Correspondence should be addressed:** Ruslan V. Nazarenko  
nazrusvad@gmail.com

**Received:** 22.02.2025 **Accepted:** 17.03.2025 **Published online:** 31.03.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.016

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Последние десятилетия ознаменовались значительными достижениями в самых различных областях, связанных с наукоемкими технологиями. Не исключением стала и репродуктивная медицина. С каждым годом появляется все больше методов исследования биологических материалов, привлекающих внимание ученых.

Одним из новых методов является рамановская спектроскопия (или спектроскопия комбинационного рассеяния), принципы которой описаны уже более 80 лет назад. Несмотря на давнюю историю, только совершенствование аппаратуры и программного обеспечения позволило применить эту методику для исследования детальной молекулярной структуры («отпечатка») биологического образца.

Неуклонно растет интерес исследователей к проблеме мужского бесплодия вообще и, в частности, к идентификации поломок ядерной ДНК сперматозоида. Известно, что сперматозоид может обладать хорошей морфологией и подвижностью согласно критериям оценки Всемирной организации здравоохранения, однако эмбрион, образовавшийся при оплодотворении яйцеклетки таким сперматозоидом, отличается плохим качеством, низким уровнем имплантации и часто останавливается в развитии [1–2]. Часть поломок ДНК в сперматозоиде может восстановить яйцеклетка, но при накоплении критической массы повреждений, репаративной системы ооцита оказывается недостаточно. В связи с этим возрастает интерес к исследованию ядерной ДНК сперматозоида и оценки ее функционального состояния. Так как рутинные методы исследования эякулята при помощи световой микроскопии не позволяют получить такую информацию, в последнее время стали широко распространяться дополнительные методы оценки сперматозоида. В частности это касается методов исследования фрагментации ДНК сперматозоидов [3–7]. К ним можно отнести: окраску анилиновым голубым, хромомицином АЗ, метод дисперсии хроматина (Comet), TUNEL, SCSA и др. К сожалению, все эти методы деструктивны, а, следовательно, несут крайне мало практически полезной информации для использования во вспомогательных репродуктивных технологиях. Существует потребность в методе, который соответствовал бы следующим критериям: позволял исследовать единственный сперматозоид без его повреждения, позволял проводить оценку целостности ядерной ДНК сперматозоида и его функционального состояния, т. е. биохимического и метаболического профиля, и использования данного сперматозоида для последующего оплодотворения методом ИКСИ (интрацитоплазматическое введение сперматозоида в яйцеклетку). С учетом вышеизложенных требований весьма перспективным представляется изучение возможностей конфокальной рамановской спектроскопии для получения более глубокой информации о строении и функциональном состоянии сперматозоида.

В последнее время появляется все больше работ, посвященных применению конфокальной рамановской спектроскопии для исследования биологических тканей, живых клеток, субклеточных органелл и метаболических внутриклеточных процессов. Однако существует не так много работ по изучению спектральных характеристик сперматозоида. В 1980 г. была применена рамановская спектроскопия на живой клетке с использованием сперматозоида лосося [8]. При сравнении рамановских спектров, полученных от сперматозоидов с нормальной и аномальной морфологией [9], исследователи пришли

к выводу, что не всегда морфология сперматозоида коррелирует с правильной упаковкой ее ядерной ДНК. При изучении спектров, полученных от субклеточных органелл, а также влияния на них УФ-излучения [10] описаны спектры от акросомы, ядра и шейки сперматозоида. Работу по применению рамановской спектроскопии в визуализации повреждений ядерной ДНК сперматозоида продолжили и другие авторы [11]. Для нарушения структуры ДНК они использовали УФ-облучение и зафиксировали характерное изменение пиков в области 1095/1050 см<sup>-1</sup>. Было также описано оксидативное повреждение ДНК в реакции Fenton с перекисью водорода [12]. Спектры, полученные с поврежденных таким образом сперматозоидов, полностью соответствовали предположенным ранее [11]. Нами было высказано предположение о связи морфологии сперматозоида, целостности его ядерной ДНК и рамановских спектров, полученных с области ядра [13]. Впоследствии эти результаты были подтверждены другими авторами с использованием красителей хромомицина АЗ, анилинового голубого и акридинового оранжевого для комплексной оценки нуклеопротеинового комплекса сперматозоида [14].

В эпоху революции omics (метабомика, протеомика и т. д.) рамановская спектроскопия является мощным инструментом для исследования биохимических процессов в клетке. Однако использование этого метода и интерпретация результатов невозможны без привлечения специалистов — физиков, химиков, математиков, так как знания и навыки, необходимые при работе с данной методикой, выходят далеко за пределы биологического или медицинского образования.

Цель исследования — получить информацию о спектральных характеристиках клеточных органелл сперматозоида человека. Оценить влияние повреждающего действия рентгеновского излучения на нуклеопротеиновый комплекс ядра сперматозоида человека по изменению рамановского спектра.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Здоровые доноры сдавали образцы спермы с помощью мастурбации. Период полового воздержания составлял 2–7 дней.

Критерии включения доноров спермы в исследование: возраст 18–35 лет; отсутствие гемотрансмиссивных инфекций; отсутствие инфекций, передающихся половым путем; отсутствие тяжелых хронических соматических заболеваний; отсутствие психических заболеваний; нормальный мужской кариотип 46 XY.

Критерии исключения доноров спермы из исследования: повышенная температура тела на момент сдачи эякулята; прием антибиотиков, глюкокортикоидов, антидепрессантов на момент сдачи эякулята; отсутствие требуемого (2–7 дней) периода полового воздержания.

В каждом случае выполняли рутинное семиологическое исследование эякулята при помощи световой микроскопии. Результаты интерпретировали согласно Рекомендациям ВОЗ 2010 г., результаты соответствовали нормозооспермии.

## Процедура пробоподготовки перед конфокальной рамановской спектроскопией

Эякулят центрифугировали в двойном градиенте плотности (FertiPro, Breenem; Бельгия) в течение 20 минут при 415 g.

После удаления супернатанта осадок ресуспендировали с PBS (phosphate buffered saline; Sigma–Aldrich, США) при 37 °С и повторно центрифугировали в течение 10 мин при 415 g. Далее 10 мкл суспензии сперматозоидов наносили на алюминиевую подложку, препарат фиксировали 70%-м спиртом и высушивали на воздухе.

**Конфокальная рамановская спектроскопия**

Исследования выполняли на конфокальном рамановском микроскопе Senterra (Bruker, Германия). Прибор состоит из двух основных блоков — конфокального бинокулярного микроскопа с возможностью оцифровки изображения и спектрометра. Полностью конфокальная система способна приспособляться к трем различным возбуждающим длинам волн, при этом обеспечивая максимально возможное пространственное разрешение. Так как Senterra базируется на оптическом микроскопе, доступны все необходимые инструменты для визуальной характеристики образца. Спектральный анализ различных компартментов (ядра, акросомы, шейки) сперматозоида проводили при длине волны возбуждающего лазера 532 нм и мощности 10 мВт в диапазоне 280–1730 см<sup>-1</sup> с разрешением 3–5 см<sup>-1</sup>. Время накопления сигнала в точке составило 3 раза по 20 с. Безопасность воздействия лазерного излучения на клетку и отсутствие фотоиндуцированного повреждения при указанных параметрах мощности подтверждены в литературе [15].

**Предварительная обработка спектров**

Каждый спектр анализировали в диапазоне 680–1700 см<sup>-1</sup> после коррекции базовой линии полиномиальной функцией 4-й степени (Polynomial baseline fitting) и сглаживания по методу скользящего среднего по 21 точке. Кроме того была выполнена стандартизация нормировкой вариации (SNV, standard normal variate) всех спектров.

На основе преобработанных спектров составили матрицу данных X (176 × 510), где в каждой строке записаны интенсивности рамановских спектров в интервале 680–1700 см<sup>-1</sup> с шагом 2 см<sup>-1</sup>, а количество строк соответствует количеству спектров.

Вторым этапом оценивали последствия повреждающего воздействия рентгеновского излучения на сперматозоид. Для этого суспензию сперматозоидов разделяли на три аликвоты. Первую аликвоту составлял контрольный образец; вторую и третью аликвоты подвергали воздействию фокусированного пучка рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин соответственно. Полученные результаты сравнивали между собой.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Было исследовано 19 образцов спермы, взятой у 19 здоровых доноров в возрасте от 18 до 35 лет. Всего было снято 176 спектров; определены спектры, присущие сперматозоиду с нормальной морфологией.

На рис. 1А представлен морфологически нормальный сперматозоид. Точками обозначены участки, с которых производилось снятие спектров. Метка номер 1 соответствует ядру сперматозоида, номер 2 — акросоме, номер 3 — средней части. На рис. 1Б представлен сравнительный график спектральных характеристик, полученных с каждого участка.

Рамановские спектры, полученные от ядра интактных сперматозоидов и сперматозоидов, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин, представлены на рис. 2.

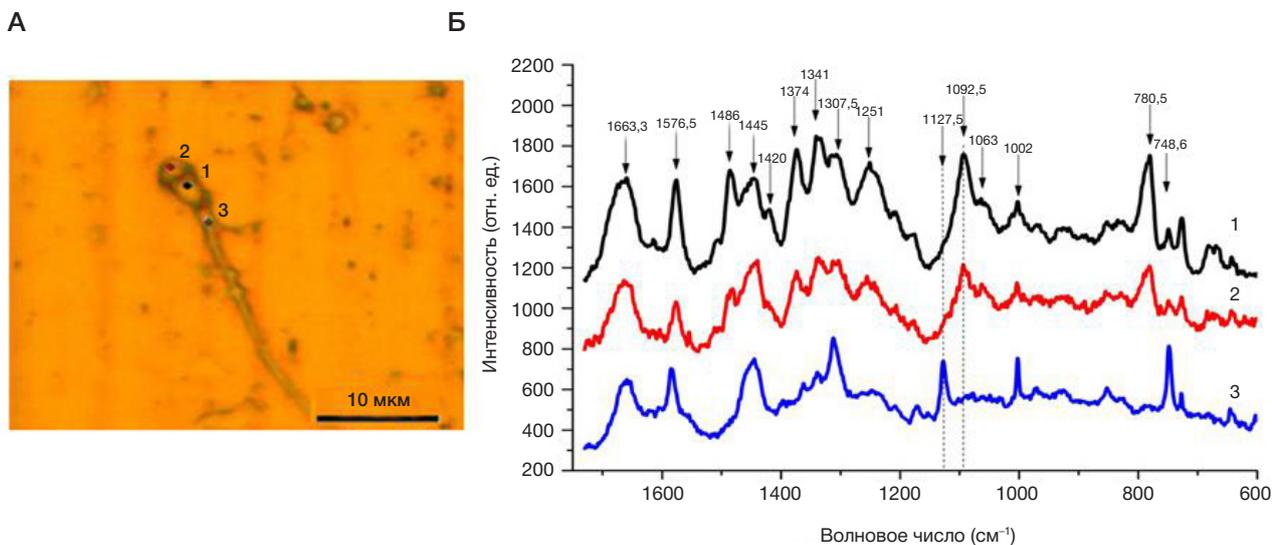
Несмотря на разную интенсивность в полученных спектрах, мы не отметили различий в основных рамановских пиках, присущих клеткам при повреждении ДНК при воздействии рентгеновского излучения в течение 5 и 10 мин по сравнению с интактными образцами.

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

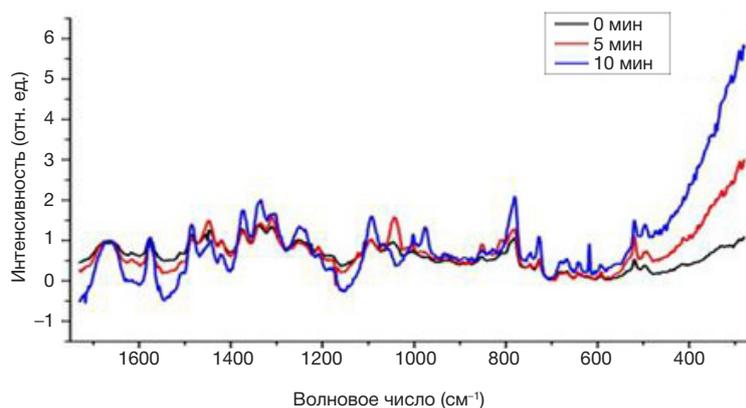
Как причины, приводящие к неправильному развитию сперматозоида или его последующему повреждению, крайне разнообразны, так и проявления подобных нарушений имеют мультивалентную природу.

Опираясь на данные литературы, мы сопоставили полученные нами пики, регистрируемые при рамановской спектроскопии с соответствующими им группами атомов (см. таблицу).

При анализе спектров сперматозоида (рис. 1Б) можно выделить следующие характерные пики.



**Рис. 1. А.** Микрофотография морфологически нормального сперматозоида. 1 (черная точка) — фокусировка луча на области ядра; 2 (красная точка) — фокусировка луча на акросоме; 3 (голубая точка) — фокусировка луча на шейке сперматозоида. **Б.** Спектральные характеристики, полученные с области ядра (черная линия — 1), с акросомы (красная линия — 2), с шейки сперматозоида (голубая линия — 3)



**Рис. 2.** Спектральные характеристики, полученные с морфологически нормального интактного сперматозоида (черная линия), при воздействии рентгеновского излучения в течение 5 мин (красная линия), в течение 10 мин (синяя линия)

*Присущие ДНК ядра* ( $1092\text{ см}^{-1}$  и  $780\text{ см}^{-1}$ ). Пик  $1092\text{ см}^{-1}$  является маркером В-ДНК и Z-ДНК. В норме для него характерно пологое или горизонтальное плечо в области  $1063\text{ см}^{-1}$ . Данная особенность присуща ядру с неповрежденной ДНК. Пик в области  $780\text{ см}^{-1}$  соответствует вибрациям тимина и цитозина, а также остову ДНК. По мнению некоторых авторов, данный пик служит маркером протаминовой упаковки ДНК, что было подтверждено более поздними исследованиями [9, 16]. Тройной пик в областях  $1420\text{ см}^{-1}$ ,  $1445\text{ см}^{-1}$  и  $1486\text{ см}^{-1}$  отличается определенной формой в виде «лестницы» с наиболее высокой частью в области  $1486\text{ см}^{-1}$ . Пик, характерный для аминокислоты фенилаланин ( $1002\text{ см}^{-1}$ ), является постоянным и присутствует практически на всех графиках с разной интенсивностью.

*Присущие акросоме.* Анализируя спектральные характеристики акросомы, можно отметить общее снижение интенсивности практически всех пиков. Характерно изменение формы тройного пика  $1420\text{ см}^{-1}$ ,  $1445\text{ см}^{-1}$  и  $1486\text{ см}^{-1}$  с преобладанием средней части в области  $1445\text{ см}^{-1}$ , что соответствует метиленовой деформации эндогенных липидов.

*Присущие средней части сперматозоида (шейке).* Спектральные характеристики средней части отличаются пиком высокой интенсивности в области  $748\text{ см}^{-1}$  — маркером присутствия митохондрий [4]. Также растет интенсивность пика  $1576\text{ см}^{-1}$ , который помимо нуклеиновых кислот соответствует большому количеству

АТФ [10]. Обращают на себя внимание исчезновение пика  $1092\text{ см}^{-1}$  и перемещение его в область  $1127\text{ см}^{-1}$ . Возможно это связано с присутствием митохондриальной ДНК, но подтверждения этому в источниках литературы мы не нашли.

Отсутствие значимых изменений в спектрах при воздействии рентгеновского излучения может быть объяснено достаточно высокой стабильностью интактного нуклеопротеинового комплекса зрелого сперматозоида в отличие от активно делящихся клеток-предшественниц сперматогенного ряда.

## ВЫВОДЫ

Проведенное пилотное исследование позволило показать возможности рамановской спектроскопии в исследовании биохимических процессов и ультраструктуры сперматозоида. Были созданы собственная библиотека спектров, полученных с нормальных сперматозоидов, и модель с искусственным повреждением сперматозоидов пучком рентгеновского излучения. Исследование проведено на фиксированном сперматозоиде, тем не менее, при помощи конфокальной рамановской спектроскопии с использованием оптического (лазерного) пинцета теоретически возможно отбирать неповрежденный живой сперматозоид и использовать его для оплодотворения с помощью ИКСИ. Нужны дальнейшие работы в этом направлении.

**Таблица.** Основные рамановские пики и соответствующие им группы атомов [9, 17–21]

Волновое число, $\text{см}^{-1}$	Нуклеиновая кислота	Аминокислоты	Липиды
748	U, C		
782	T, C, остов ДНК		
1002		Фенилаланин	
1045	Маркер повреждения ДНК		
1092	$\text{PO}_2^-$ маркер В-ДНК и Z-ДНК		
1251	A, C	N–H и C–H Амид III	$\text{PO}_2^-$ Фосфолипиды
1307	A	N–H и C–H Амид III	
1341	G	N–H и C–H Амид III	
1374	A, T, C		
1420	A		
1445			Метиленовая деформация (эндогенные липиды)
1486	G, A		
1576	G, A		
1663	T	C=O Амид I	C=C ненасыщенные липидные связи

## Литература

- Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2010; 25 (7): 1609–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq116>.
- Fu W, Cui Q, Yang Z, Bu Z, Shi H, Bi B, et al. High sperm DNA fragmentation increased embryo aneuploidy rate in patients undergoing preimplantation genetic testing. *Reproductive BioMedicine Online*. 2023; 47 (6): 103366. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103366>.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*. Wiley-Blackwell. 2002; 23 (1): 25–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier BV. 2006; 12 (6): 715–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61083-8).
- Chi H-J, Chung D-Y, Choi S-Y, Kim J-H, Kim G-Y, Lee J-S, et al. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. The Korean Society for Reproductive Medicine (KAMJE); 2011; 38 (1): 10. Available from: <http://dx.doi.org/10.5653/cerm.2011.38.1.10>.
- Sharma R, Iovine C, Agarwal A, Henkel R. TUNEL assay — Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*. 2020; 53 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/and.13738>.
- Andrabi SW, Ara A, Saharan A, Jaffar M, Gugnani N, Esteves SC. Sperm DNA fragmentation test: usefulness in assessing male fertility and assisted reproductive technology outcomes. *Panminerva Medica*. 2023; 65 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.23736/s0031-0808.23.04836-x>.
- Kubasek WL, Wang Y, Thomas GA, Patapoff TW, Schoenwaelder KH, Van der Sande JH, et al. Raman spectra of the model B-DNA oligomer d(CGCGAATTCGCG)2 and of the DNA in living salmon sperm show that both have very similar B-type conformations. *Biochemistry*. American Chemical Society (ACS). 1986; 25 (23): 7440–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00371a028>.
- Huser T, Orme CA, Hollars CW, Corzett MH, Balhorn R. Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells. *Journal of Biophotonics*. Wiley-Blackwell. 2009; 2 (5): 322–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.200910012>.
- Meister K, Schmidt DA, Bründermann E, Havenith M. Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2010; 135 (6): 1370. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/b927012d>.
- Mallidis C, Wistuba J, Bleisteiner B, Damm OS, Gross P, Wubbeling F, et al. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2011; 26 (7): 1641–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der122>.
- Sánchez V, Redmann K, Wistuba J, Wübbeling F, Burger M, Oldenhof H, et al. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy. *Fertility and Sterility*. Elsevier BV. 2012; 98 (5): 1124–9.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1059>.
- Nazarenko RV, Irzhak AV, Pomerantsev AL, Rodionova OYe. Confocal Raman spectroscopy and multivariate data analysis for evaluation of spermatozoa with normal and abnormal morphology. A feasibility study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2018; 182: 172–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.10.002>.
- Jahmani MY, Hammadeh ME, Al Smadi MA, Baller MK. Label-Free Evaluation of Chromatin Condensation in Human Normal Morphology Sperm Using Raman Spectroscopy. *Reproductive Sciences*. 2021; 28 (9): 2527–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s43032-021-00494-6>.
- Edengeiser E, Meister K, Bründermann E, Büning S, Ebbinghaus S, Havenith M. Non-invasive chemical assessment of living human spermatozoa. *RSC Adv*. 2015; 5: 10424–9. Available from: <https://doi.org/10.1039/c4ra12158a>.
- Li M, Ji Y, Wang D, Zhang Y, Zhang H, Tang Y, et al. Evaluation of Laser Confocal Raman Spectroscopy as a Non-Invasive Method for Detecting Sperm DNA Contents. *Frontiers in Physiology*. 2022; 13. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.827941>.
- Li X, Wang M, Chen H, Li Q, Yang H, Xu H, et al. Flow cytometric and near-infrared Raman spectroscopic investigation of quality in stained, sorted, and frozen-thawed buffalo sperm. *Animal Reproduction Science*. Elsevier BV. 2016; 170: 90–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.008>.
- Ellis DI, Cowcher DP, Ashton L, O'Hagan S, Goodacre R. Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2013; 138 (14): 3871. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c3an00698k>.
- Ferrara M, Di Caprio G, Managò S, De Angelis A, Sirtolo L, Coppola G, et al. Label-Free Imaging and Biochemical Characterization of Bovine Sperm Cells. *Biosensors*. MDPI AG. 2015; 5 (2): 141–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/bios5020141>.
- Li N, Chen D, Xu Y, Liu S, Zhang H. Confocal Raman microspectroscopy for rapid and label-free detection of maleic acid-induced variations in human sperm. *Biomedical Optics Express*. The Optical Society. 2014; 5 (5): 1690. Available from: <http://dx.doi.org/10.1364/boe.5.001690>.
- Rimskaya E, Gorevoy A, Shelygina S, Perevedentseva E, Timurzieva A, Saraeva I, et al. Multi-Wavelength Raman Differentiation of Malignant Skin Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (13): 7422. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25137422>.

## References

- Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2010; 25 (7): 1609–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq116>.
- Fu W, Cui Q, Yang Z, Bu Z, Shi H, Bi B, et al. High sperm DNA fragmentation increased embryo aneuploidy rate in patients undergoing preimplantation genetic testing. *Reproductive BioMedicine Online*. 2023; 47 (6): 103366. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103366>.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*. Wiley-Blackwell. 2002; 23 (1): 25–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C. Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reproductive BioMedicine Online*. Elsevier BV. 2006; 12 (6): 715–21. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61083-8).
- Chi H-J, Chung D-Y, Choi S-Y, Kim J-H, Kim G-Y, Lee J-S, et al. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. The Korean Society for Reproductive Medicine (KAMJE); 2011; 38 (1): 10. Available from: <http://dx.doi.org/10.5653/cerm.2011.38.1.10>.
- Sharma R, Iovine C, Agarwal A, Henkel R. TUNEL assay — Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*. 2020; 53 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/and.13738>.
- Andrabi SW, Ara A, Saharan A, Jaffar M, Gugnani N, Esteves SC. Sperm DNA fragmentation test: usefulness in assessing

- male fertility and assisted reproductive technology outcomes. *Panminerva Medica*. 2023; 65 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.23736/s0031-0808.23.04836-x>.
8. Kubasek WL, Wang Y, Thomas GA, Patapoff TW, Schoenwaelder KH, Van der Sande JH, et al. Raman spectra of the model B-DNA oligomer d(CGCGAATTCGCG)2 and of the DNA in living salmon sperm show that both have very similar B-type conformations. *Biochemistry*. American Chemical Society (ACS). 1986; 25 (23): 7440–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00371a028>.
  9. Huser T, Orme CA, Hollars CW, Corzett MH, Balhorn R. Raman spectroscopy of DNA packaging in individual human sperm cells distinguishes normal from abnormal cells. *Journal of Biophotonics*. Wiley-Blackwell. 2009; 2 (5): 322–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jbio.200910012>.
  10. Meister K, Schmidt DA, Bründermann E, Havenith M. Confocal Raman microspectroscopy as an analytical tool to assess the mitochondrial status in human spermatozoa. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2010; 135 (6): 1370. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/b927012d>.
  11. Mallidis C, Wistuba J, Bleisteiner B, Damm OS, Gross P, Wübbeling F, et al. In situ visualization of damaged DNA in human sperm by Raman microspectroscopy. *Human Reproduction*. Oxford University Press (OUP). 2011; 26 (7): 1641–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der122>.
  12. Sánchez V, Redmann K, Wistuba J, Wübbeling F, Burger M, Oldenhof H, et al. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman microspectroscopy. *Fertility and Sterility*. Elsevier BV. 2012; 98 (5): 1124–9.e3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1059>.
  13. Nazarenko RV, Irzhak AV, Pomerantsev AL, Rodionova OYe. Confocal Raman spectroscopy and multivariate data analysis for evaluation of spermatozoa with normal and abnormal morphology. A feasibility study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2018; 182: 172–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.10.002>.
  14. Jahmani MY, Hammadeh ME, Al Smadi MA, Baller MK. Label-Free Evaluation of Chromatin Condensation in Human Normal Morphology Sperm Using Raman Spectroscopy. *Reproductive Sciences*. 2021; 28 (9): 2527–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s43032-021-00494-6>.
  15. Edengeiser E, Meister K, Bründermann E, Büning S, Ebbinghaus S, Havenith M, Non-invasive chemical assessment of living human spermatozoa. *RSC Adv*. 2015; 5: 10424–9. Available from: <https://doi.org/10.1039/c4ra12158a>.
  16. Li M, Ji Y, Wang D, Zhang Y, Zhang H, Tang Y, et al. Evaluation of Laser Confocal Raman Spectroscopy as a Non-Invasive Method for Detecting Sperm DNA Contents. *Frontiers in Physiology*. 2022; 13. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2022.827941>.
  17. Li X, Wang M, Chen H, Li Q, Yang H, Xu H, et al. Flow cytometric and near-infrared Raman spectroscopic investigation of quality in stained, sorted, and frozen-thawed buffalo sperm. *Animal Reproduction Science*. Elsevier BV. 2016; 170: 90–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.008>.
  18. Ellis DI, Cowcher DP, Ashton L, O'Hagan S, Goodacre R. Illuminating disease and enlightening biomedicine: Raman spectroscopy as a diagnostic tool. *The Analyst*. Royal Society of Chemistry (RSC). 2013; 138 (14): 3871. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c3an00698k>.
  19. Ferrara M, Di Caprio G, Managò S, De Angelis A, Sirloto L, Coppola G, et al. Label-Free Imaging and Biochemical Characterization of Bovine Sperm Cells. *Biosensors*. MDPI AG. 2015; 5 (2): 141–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/bios5020141>.
  20. Li N, Chen D, Xu Y, Liu S, Zhang H. Confocal Raman microspectroscopy for rapid and label-free detection of maleic acid-induced variations in human sperm. *Biomedical Optics Express*. The Optical Society. 2014; 5 (5): 1690. Available from: <http://dx.doi.org/10.1364/boe.5.001690>.
  21. Rimsкая E, Gorevoy A, Shelygina S, Perevedentseva E, Timurzieva A, Saraeva I, et al. Multi-Wavelength Raman Differentiation of Malignant Skin Neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25 (13): 7422. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25137422>.

## ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СТРАТЕГИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА–КОНОВАЛОВА: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

А. В. Иваненко, В. Д. Стародубова, А. Г. Шохина <sup>✉</sup>

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

Болезнь Вильсона-Коновалова — редкое наследственное заболевание, вызванное мутациями гена *ATP7B*, приводящее к нарушению метаболизма меди и ее токсическому накоплению в печени, мозге и других органах. Основные проявления — поражение печени, неврологические и психиатрические симптомы. Применение современных методов лечения (D-пеницилламин, триентин, соли цинка) улучшает прогноз, но ограничено побочными эффектами и сложностью соблюдения терапии. Трансплантацию печени применяют при тяжелых формах, однако она ограничена дефицитом доноров и необходимостью иммуносупрессии. Перспективные направления, на наш взгляд, включают генную терапию с использованием AAV-векторов и CRISPR/Cas9, мРНК-платформы и клеточные технологии, однако эти подходы требуют дальнейших исследований для повышения эффективности, безопасности и доступности.

**Ключевые слова:** болезнь Вильсона–Коновалова, моногенное заболевание, *ATP7B*, перегрузка медью, генная терапия, клеточная терапия

**Финансирование:** работа поддержана денежными средствами гранта Российского научного фонда (грант РФФ №24-74-10106).

**Вклад авторов:** А. В. Иваненко, В. Д. Стародубова — написание статьи; А. Г. Шохина — разработка концепции, написание и редактирование статьи, получение финансирования.

✉ **Для корреспонденции:** Арина Геннадиевна Шохина  
ул. Островитянова, д. 1, стр. 1, г. Москва, 117513, Россия; a.g.shokhina@yandex.ru

**Статья получена:** 02.04.2025 **Статья принята к печати:** 20.04.2025 **Опубликована онлайн:** 28.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.022

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## THERAPEUTIC STRATEGIES FOR WILSON'S DISEASE: CURRENT STATE AND PROSPECTS

Ivanenko AV, Starodubova VD, Shokhina AG <sup>✉</sup>

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Wilson's disease is a rare hereditary disorder caused by the *ATP7B* gene mutations that leads to copper metabolism disturbances and toxic copper accumulation in the liver, brain, and other organs. The main manifestations include liver damage, neurological and psychiatric symptoms. The use of advanced treatment methods (D-penicillamine, trientine, zinc salts) improves the outcome, but is limited by side effects and complexity of adherence to therapy. Liver transplantation is used in severe forms, but it is limited by the donor shortage and the need for immunosuppression. In our opinion, promising areas include gene therapy involving the use of AAV vectors and CRISPR/Cas9, mRNA platforms, and cell technologies. However, these approaches require further research for the efficacy, safety, and accessibility improvement.

**Keywords:** Wilson's disease, monogenic disorder, *ATP7B*, copper overload, gene therapy, cellular therapy

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation grant (RSF grant No. 24-74-10106).

**Author contribution:** Ivanenko AV, Starodubova VD — manuscript writing; Shokhina AG — developing the concept, manuscript writing and editing, obtaining funding.

✉ **Correspondence should be addressed:** Arina G. Shokhina  
Ostrovityanova, 1, str. 1, Moscow, 117513, Russia; a.g.shokhina@yandex.ru

**Received:** 02.04.2025 **Accepted:** 20.04.2025 **Published online:** 28.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.022

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Болезнь Вильсона–Коновалова (БВК) — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутациями гена *ATP7B*, которое нарушает метаболизм меди, приводя к ее токсическому накоплению в печени, мозге и других тканях. Клинические проявления включают, в первую очередь, поражение печени (гепатит, цирроз, острая печеночная недостаточность), неврологические симптомы (тремор, дистония, паркинсонизм) и психиатрические расстройства (депрессия, эмоциональная лабильность). Диагностика основана на сочетании клинических данных, лабораторных тестов (уровень церулоплазмينا, медь в крови и моче) и молекулярно-генетического анализа. Применение современных методов лечения значительно улучшает прогноз для пациентов, однако по-прежнему ограничено побочными эффектами, сложностью соблюдения режима лечения и недостаточной эффективностью контроля

симптомов. В данной статье рассмотрена эволюция терапевтических подходов лечения БВК: от традиционных фармакологических методов до перспективных генетических и клеточных технологий.

### Современные фармакологические подходы: контроль перегрузки медью

D-пеницилламин (DPA) и триентин — основные хелаторы, которые усиливают выведение меди с мочой и приводят к нормализации свободной меди в крови через 1–2 года терапии или 6–48 месяцев соответственно [1]. Однако DPA вызывает серьезные побочные эффекты, такие как иммуно-опосредованный нефрит и неврологическое ухудшение у 14–21% пациентов с неврологическими симптомами. Триентин является более безопасной

альтернативой, но также связан с риском неврологических осложнений [2].

Соли цинка ингибируют абсорбцию меди за счет индукции экспрессии металлотионеинов в энтероцитах. Хотя этот метод относительно безопасен, терапия цинком требует нескольких месяцев для достижения эффекта и не подходит при острых состояниях [3]. Кроме того, есть когорты пациентов, которые не отвечают на терапию солями цинка.

Тетратиомолибдат (ТТМ) и метанобактины представляют собой новейшие экспериментальные агенты, которые показали многообещающие результаты в доклинических исследованиях [4, 5]. Однако разработка ТТМ была прекращена на фазе III клинических испытаний из-за смешанной эффективности и побочных эффектов (анемия, нейтропения) [6]. Доклинические и клинические испытания метанобактина в данный момент не завершены.

### **Трансплантация: радикальный, но ограниченный подход**

Трансплантация печени является радикальным методом лечения для пациентов с БВК, страдающих от острой печеночной недостаточности или не поддающихся медикаментозной терапии. Однако применение этого метода ограничено дефицитом донорских органов, периоперационными рисками и необходимостью пожизненной иммуносупрессии. Иммуносупрессия увеличивает восприимчивость к инфекциям и развитию злокачественных новообразований, что делает трансплантацию крайней мерой.

Трансплантация гепатоцитов представляет собой минимально инвазивную альтернативу, при которой изолированные донорские клетки вводят в воротную вену печени. Исследования на животных моделях показали снижение уровня меди и улучшение выживаемости [7, 8]. Однако такие проблемы, как низкая эффективность приживления клеток, иммунное отторжение и нарушение репопуляции печени, ограничивают клиническое применение.

### **Генная терапия: устранение первопричины**

Генотерапия направлена на восстановление функции *ATP7B* путем доставки функционального гена в гепатоциты. Применение рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) показало многообещающие результаты в доклинических исследованиях и ранних клинических испытаниях: tATP7b (UX701) (укороченный вариант *ATP7B*, доставляемый через AAV8) продемонстрировал устойчивый терапевтический эффект у мышей и сейчас проходит клинические испытания фазы I/II/III [9]. MiniATP7B (VTX-801) — другой укороченный вариант, который показал дозозависимую эффективность у мышей и который тестируют в клинических испытаниях фазы I/II [10].

Метод CRISPR/Cas9 предоставляет возможность точечной коррекции мутаций, однако его применение

сталкивается с такими проблемами, как низкая эффективность редактирования в неделящихся гепатоцитах и потенциальные нецелевые эффекты [11]. Редакторы оснований (base editors) и праймированные редакторы (prime editors) расширяют возможности коррекции без создания двухцепочечных разрывов, но требуют дальнейшей оптимизации для клинического применения.

мРНК-технологии представляют собой многообещающий подход для лечения болезни Вильсона. В отличие от вирусных векторов (например, AAV), мРНК не интегрируется в геном, что минимизирует риск инсерционного мутагенеза. Липидные наночастицы (LNP), используемые для доставки мРНК, обладают тропностью к печени. Хотя прямые испытания мРНК-терапии для БВ еще не начаты, успехи в лечении других патологий печени с помощью мРНК-платформ, например транстриетинового амилоидоза, подтверждают их работоспособность [12]. В частности, терапия NTLA-2001 на основе CRISPR уже показала многообещающие результаты [13].

### **Терапия на основе стволовых клеток: восстановление функции печени**

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) могут быть дифференцированы в гепатоциты для аутологичной трансплантации, что потенциально устраняет риск иммунного отторжения. Однако текущие протоколы позволяют создать незрелые гепатоциты с уменьшенной функциональностью по сравнению со зрелыми клетками взрослого организма [14]. Основным направлением, обуславливающим в перспективе улучшение созревания клеток и эффективности их приживления, — культивирование в 3D-системах [15].

Комбинация генной терапии с технологиями стволовых клеток может обеспечить возобновляемый источник генетически скорректированных гепатоцитов для трансплантации, что решит проблему генетических дефектов, а также необходимость регенерации печени.

### **ВЫВОДЫ**

Терапевтические подходы к лечению болезни Вильсона-Коновалова быстро эволюционируют от симптоматического управления к потенциально радикальным методам, направленным на устранение генетической причины заболевания. Хотя традиционные методы остаются важными для текущего лечения, инновации в области генной терапии, редактирования генома и технологий стволовых клеток обладают серьезным потенциалом для долгосрочного управления болезнью и ее полного излечения.

Необходимы дальнейшие исследования для оптимизации этих методов с целью их клинического применения, обеспечения безопасности, эффективности и доступности для всех пациентов, страдающих от этого тяжелого расстройства.

## Литература

- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology*. 2012; 56 (3): 671–85. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.007.
- Weiss KH, et al. Zinc Monotherapy Is Not as Effective as Chelating Agents in Treatment of Wilson Disease. *Gastroenterology*. 2011; 140 (4): 1189–98.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.12.034.
- Munk DE, et al. Effect of oral zinc regimens on human hepatic copper content: a randomized intervention study. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 14714. DOI: 10.1038/s41598-022-18872-8.
- Solovyev N, Ala A, Schilsky M, Mills C, Willis K, Harrington CF. Biomedical copper speciation in relation to Wilson's disease using strong anion exchange chromatography coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2020; 1098: 27–36. DOI: 10.1016/j.aca.2019.11.033.
- Snijders RJALM, et al. An open-label randomised-controlled trial of azathioprine vs. mycophenolate mofetil for the induction of remission in treatment-naive autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*. 2024; 80 (4): 576–85. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.11.032.
- Medici V, Sturniolo GC. Tetrathiomolybdate, a copper chelator for the treatment of Wilson disease, pulmonary fibrosis and other indications. *IDrugs*. 2008; 11 (8): 592–606.
- Fujiyoshi J, et al. Therapeutic potential of hepatocyte-like-cells converted from stem cells from human exfoliated deciduous teeth in fulminant Wilson's disease. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 1535. DOI: 10.1038/s41598-018-38275-y.
- Sauer V, et al. Repeated transplantation of hepatocytes prevents fulminant hepatitis in a rat model of Wilson's disease. *Liver Transplantation*. 2012; 8 (2): 248–59. DOI: 10.1002/lt.22466.
- Leng Y, et al. Long-Term Correction of Copper Metabolism in Wilson's Disease Mice with AAV8 Vector Delivering Truncated ATP7B. *Human Gene Therapy*. 2019; 30 (12): 1494–504. DOI: 10.1089/hum.2019.148.
- Murillo O, et al. Liver Expression of a MiniATP7B Gene Results in Long-Term Restoration of Copper Homeostasis in a Wilson Disease Model in Mice. *Hepatology*. 2019; 70 (1): 108–26. DOI: 10.1002/hep.30535.
- Pöhler M, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of mutated copper transporter ATP7B. *PLoS ONE*. 2020; 15 (9): e0239411. DOI: 10.1371/journal.pone.0239411.
- Fontana M, et al. Vutrisiran in Patients with Transthyretin Amyloidosis with Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2025; 392 (1): 33–44. DOI: 10.1056/NEJMoa2409134.
- Gillmore JD, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021; 385 (6): 493–502. DOI: 10.1056/NEJMoa2107454.
- Baxter M, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *Journal of Hepatology*. 2015; 62 (3): 581–9. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.016.
- Suominen S, et al. Improvements in Maturity and Stability of 3D iPSC-Derived Hepatocyte-like Cell Cultures. *Cells*. 2023; 12 (19): 2368. DOI: 10.3390/cells12192368.

## References

- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology*. 2012; 56 (3): 671–85. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.007.
- Weiss KH, et al. Zinc Monotherapy Is Not as Effective as Chelating Agents in Treatment of Wilson Disease. *Gastroenterology*. 2011; 140 (4): 1189–98.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.12.034.
- Munk DE, et al. Effect of oral zinc regimens on human hepatic copper content: a randomized intervention study. *Sci Rep*. 2022; 12 (1): 14714. DOI: 10.1038/s41598-022-18872-8.
- Solovyev N, Ala A, Schilsky M, Mills C, Willis K, Harrington CF. Biomedical copper speciation in relation to Wilson's disease using strong anion exchange chromatography coupled to triple quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2020; 1098: 27–36. DOI: 10.1016/j.aca.2019.11.033.
- Snijders RJALM, et al. An open-label randomised-controlled trial of azathioprine vs. mycophenolate mofetil for the induction of remission in treatment-naive autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology*. 2024; 80 (4): 576–85. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.11.032.
- Medici V, Sturniolo GC. Tetrathiomolybdate, a copper chelator for the treatment of Wilson disease, pulmonary fibrosis and other indications. *IDrugs*. 2008; 11 (8): 592–606.
- Fujiyoshi J, et al. Therapeutic potential of hepatocyte-like-cells converted from stem cells from human exfoliated deciduous teeth in fulminant Wilson's disease. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 1535. DOI: 10.1038/s41598-018-38275-y.
- Sauer V, et al. Repeated transplantation of hepatocytes prevents fulminant hepatitis in a rat model of Wilson's disease. *Liver Transplantation*. 2012; 8 (2): 248–59. DOI: 10.1002/lt.22466.
- Leng Y, et al. Long-Term Correction of Copper Metabolism in Wilson's Disease Mice with AAV8 Vector Delivering Truncated ATP7B. *Human Gene Therapy*. 2019; 30 (12): 1494–504. DOI: 10.1089/hum.2019.148.
- Murillo O, et al. Liver Expression of a MiniATP7B Gene Results in Long-Term Restoration of Copper Homeostasis in a Wilson Disease Model in Mice. *Hepatology*. 2019; 70 (1): 108–26. DOI: 10.1002/hep.30535.
- Pöhler M, et al. CRISPR/Cas9-mediated correction of mutated copper transporter ATP7B. *PLoS ONE*. 2020; 15 (9): e0239411. DOI: 10.1371/journal.pone.0239411.
- Fontana M, et al. Vutrisiran in Patients with Transthyretin Amyloidosis with Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2025; 392 (1): 33–44. DOI: 10.1056/NEJMoa2409134.
- Gillmore JD, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2021; 385 (6): 493–502. DOI: 10.1056/NEJMoa2107454.
- Baxter M, et al. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *Journal of Hepatology*. 2015; 62 (3): 581–9. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.016.
- Suominen S, et al. Improvements in Maturity and Stability of 3D iPSC-Derived Hepatocyte-like Cell Cultures. *Cells*. 2023; 12 (19): 2368. DOI: 10.3390/cells12192368.

## ДВУХЭТАПНАЯ AAV8-ГЕНОТЕРАПИЯ РЕБЕНКА С СИНДРОМОМ КРИГЛЕРА–НАЙЯРА 1-ГО ТИПА

Д. В. Ребриков<sup>1,2</sup>✉, А. В. Дегтярёва<sup>1</sup>, Ю. Г. Янушевич<sup>2</sup>, М. С. Готьё<sup>1</sup>, Т. В. Городничева<sup>1,2</sup>, А. С. Бавыкин<sup>1,2</sup>, Л. В. Ушакова<sup>1</sup>, Е. А. Филиппова<sup>1</sup>, Д. Н. Дегтярёв<sup>1</sup>, Г. Т. Сухих<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Пироговский Университет), Москва, Россия

Синдром Криглера–Найяра 1-го типа (СКН1) является следствием дефицита фермента уридиндифосфатглюкурозилтрансферазы 1A1, кодируемого геном *UTG1A1* и проявляется при рождении тяжелой неконъюгированной гипербилирубинемией. В работе описан устойчивый клинический ответ у ребенка с СКН1, которого лечили двумя последовательными дозами AAV8-генотерапии, доставляющей кодирующую последовательность *UTG1A1*. Инфузия I ( $6 \times 10^{12}$  вг/кг) обеспечила устойчивое снижение сывороточного билирубина, что позволило ослабить фототерапию с 12 ч до 4 ч в день. Инфузия II в двойной дозе была сделана через 6 месяцев; данное решение было принято с целью полной отмены фототерапии. Однако отмена привела к резкому повышению уровня билирубина, что потребовало возобновления фототерапии. В настоящее время состояние пациента стабильно на 4-часовой ежедневной фототерапии в течение 80 недель с момента возобновления и 107 недель с момента начала терапии генотерапевтическим препаратом. Токсических побочных эффектов не наблюдалось. Плавный прирост уровня билирубина в сыворотке крови ставит вопрос о клинической целесообразности ежегодных инфузий препарата.

**Ключевые слова:** синдром Криглера–Найяра 1-го типа, AAV8, генная терапия

**Финансирование:** работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ 124020400004-9).

**Вклад авторов:** Д. В. Ребриков — анализ литературы, планирование исследования, разработка концепции и дизайна исследования, разработка концепции препарата, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. В. Дегтярёва — анализ литературы, планирование исследования, разработка концепции и дизайна исследования, обследование пациента, интерпретация данных; М. С. Готьё, Л. В. Ушакова, Е. А. Филиппова — обследование пациента; Ю. Г. Янушевич, Т. В. Городничева, А. С. Бавыкин — разработка препарата, интерпретация данных, подготовка рукописи; Д. Н. Дегтярёв, Г. Т. Сухих — разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 12 от 01 декабря 2022 г. для инфузии I) и протокол № 7 от 20 июля 2023 г. для инфузии II). Законные представители пациентки дали информированное добровольное согласие на исследование и на каждую инфузию препарата.

✉ **Для корреспонденции:** Д. В. Ребриков  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; drebrikov@gmail.com

**Статья получена:** 25.04.2025 **Статья принята к печати:** 29.04.2025 **Опубликована онлайн:** 30.04.2025

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2025.025

**Авторские права:** © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## TWO-STEP AAV8 GENE DELIVERY IN A CHILD WITH CRIGLER-NAJJAR SYNDROME TYPE I

Rebrikov DV<sup>1,2</sup>✉, Degtyareva AV<sup>1</sup>, Yanushevich YuG<sup>2</sup>, Gautier MS<sup>1</sup>, Gorodnicheva TV<sup>1,2</sup>, Bavykin AS<sup>1,2</sup>, Ushakova LV<sup>1</sup>, Filippova EA<sup>1</sup>, Degtyarev DN<sup>1</sup>, Sukhikh GT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University), Moscow, Russia

Crigler–Najjar syndrome type I, an orphan *UTG1A1* enzyme deficiency, manifests at birth with severe unconjugated hyperbilirubinemia. Here we describe sustained clinical response in a pediatric patient with Crigler–Najjar syndrome type I treated with two consecutive doses of AAV8 delivering the *UTG1A1* coding sequence. Infusion I ( $6 \times 10^{12}$  vg/kg) afforded sustained decrease in serum bilirubin, allowing substantial relaxation of the phototherapy from 12 h to 4 h daily. Infusion II at a double dose was made in 6 months; the decision was intended at complete elimination of phototherapy. However, the elimination led to a sharp increase in bilirubin levels necessitating resumption of phototherapy. The patient is currently stable on 4 h daily phototherapy for 80 weeks since the resumption and 107 weeks since the AAV8 therapy initiation. No toxic side effects were encountered. A slow incremental dynamics in serum bilirubin opens the issue of clinical advisability for subsequent infusions of the drug.

**Keywords:** Crigler–Najjar syndrome type I, AAV8, gene therapy

**Funding:** This work was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (No. 124020400004-9).

**Author contribution:** Rebrikov DV — literature analysis, study planning, development of study concept and design, development of drug concept, data interpretation, manuscript preparation; Degtyareva AV — literature analysis, study planning, development of study concept and design, patient examination, data interpretation; Gautier MS, Ushakova LV, Filippova EA — patient examination; Yanushevich YuG, Gorodnicheva TV, Bavykin AS — drug development, data interpretation, manuscript preparation; Degtyarev DN, Sukhikh GT — development of study concept and design, data interpretation.

**Compliance with ethical standards:** the therapy was approved by Ethics Committee at the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology on Dec 01 2022, Protocol #12 for infusion I, and on Jul 20 2023, Protocol #7 for infusion II. The patient's legal representatives provided voluntary informed consents for the study and for each infusion of the drug.

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis V. Rebrikov  
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; drebrikov@gmail.com

**Received:** 25.04.2025 **Accepted:** 29.04.2025 **Published online:** 30.04.2025

**DOI:** 10.24075/brsmu.2025.025

**Copyright:** © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Синдром Криглера–Найяра (СКН) — это орфанная ферментопатия, вызываемая вариантами потери функции фермента уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы 1A1, кодируемого геном *UGT1A1* [1]. Отсутствие активной уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы 1A1 приводит к накоплению конъюгатов билирубина (клинически представленных желтухой и тяжелыми неврологическими нарушениями) и является потенциально фатальным в младенчестве. Диагноз включает биохимические и молекулярно-генетические тесты на, соответственно, неконъюгированный билирубин и варианты *UGT1A1*. Никакого специфического патогенетического лечения этого состояния не было предложено, за исключением трансплантации печени при СКН 1-го типа (тяжелой форме заболевания). Пациенты нуждаются в постоянном наблюдении и находятся на постоянном удалении билирубина с помощью плазмафереза и (или) фототерапии, что сильно влияет на их качество жизни. Потенциал использования аденоассоциированного вируса серотипа 8 для лечения СКН был обоснован в доклинических исследованиях *in vivo* [2, 3]. В 2023 г. D'Antiga et al. сообщили об успешном лечении СКН1 у взрослых пациентов с использованием генного препарата с доставкой посредством AAV8 [4]. У детей эффективность применения такой терапии (спекулятивно) может быть ниже из-за высоких темпов роста и физиологического обновления клеток печени. Здесь мы описываем устойчивый клинический ответ (107 недель на момент написания статьи) у ребенка с СКН1 с использованием кодирующей последовательности *UGT1A1*, доставленной двумя последовательными дозами аденоассоциированного вирусного вектора серотипа 8 (AAV8). Это первый отчет о терапии AAV в режиме доставки двумя дозами.

## Описание клинического случая

### Дизайн и очистка вектора

В качестве матрицы использовали кДНК от здорового донора с последовательностью *UGT1A1* дикого типа. Кодирующая последовательность была клонирована в плазмиду rAAV-TBG. Конструкция rAAV-TBG-*UGT1A1* была упакована в клетках HEK293.

Частицы очищали в ступенчатом градиенте плотности иодиксанола (OptiPrep, StemCell Technologies, США) при 350 000 g, +18 °C в течение 1,5 ч (ультрацентрифуга Optima-XPN; Beckman, США). 60%-ную фракцию и половину 40%-ной фракции йодиксанола собирали, очищали диализом (Spectrum™, Fisher Scientific #0867140; размер пор 100 кДа) против (1x) буфера PBS/350 mM NaCl/0,001% Pluronic F-68 при 4 °C в течение 14–18 ч, концентрировали с помощью центрифужных фильтров Amicon®, размер пор 100 кДа (Millipore Sigma, США) и дополнительно стерилизовали шприцевой фильтрацией 0,22 мкм. Продукт, альфаглюкуронозилтрансферазаген унопаровек, количественно определяли с помощью ПЦР «в реальном времени» с плазмидной ДНК в качестве эталона. Все показатели чистоты оказались в пределах референсных значений для клинического использования; продукт содержал эндотоксин <0,64 EU/мл (Endosafe® LAL; Charles River Endosafe, США), BSA < 159 нг/мл (BSA ELISA Kit; Wuhan Fine Biotech, KHP), остаточные белки HEK293 <2 нг/мл (HEK293 NSR ELISA Kit; Cygnus Technologies, США) и был микроплазмонегативным.

### Доклинические исследования

Испытания *in vitro* проводили на клетках HeLa (ATCC, США).

Исследования на животных были одобрены Комитетом по содержанию и использованию животных Пироговского Университета. Испытания *in vivo* на мышах C57BL6 проводили в три раунда: оценка зависимости реакции от дозы, оценка токсичности передозировки и оценка постепенного исчезновения в подростковом возрасте. Контрольная группа получала идентичный объем буфера для разбавления вместо препарата (во всех экспериментах).

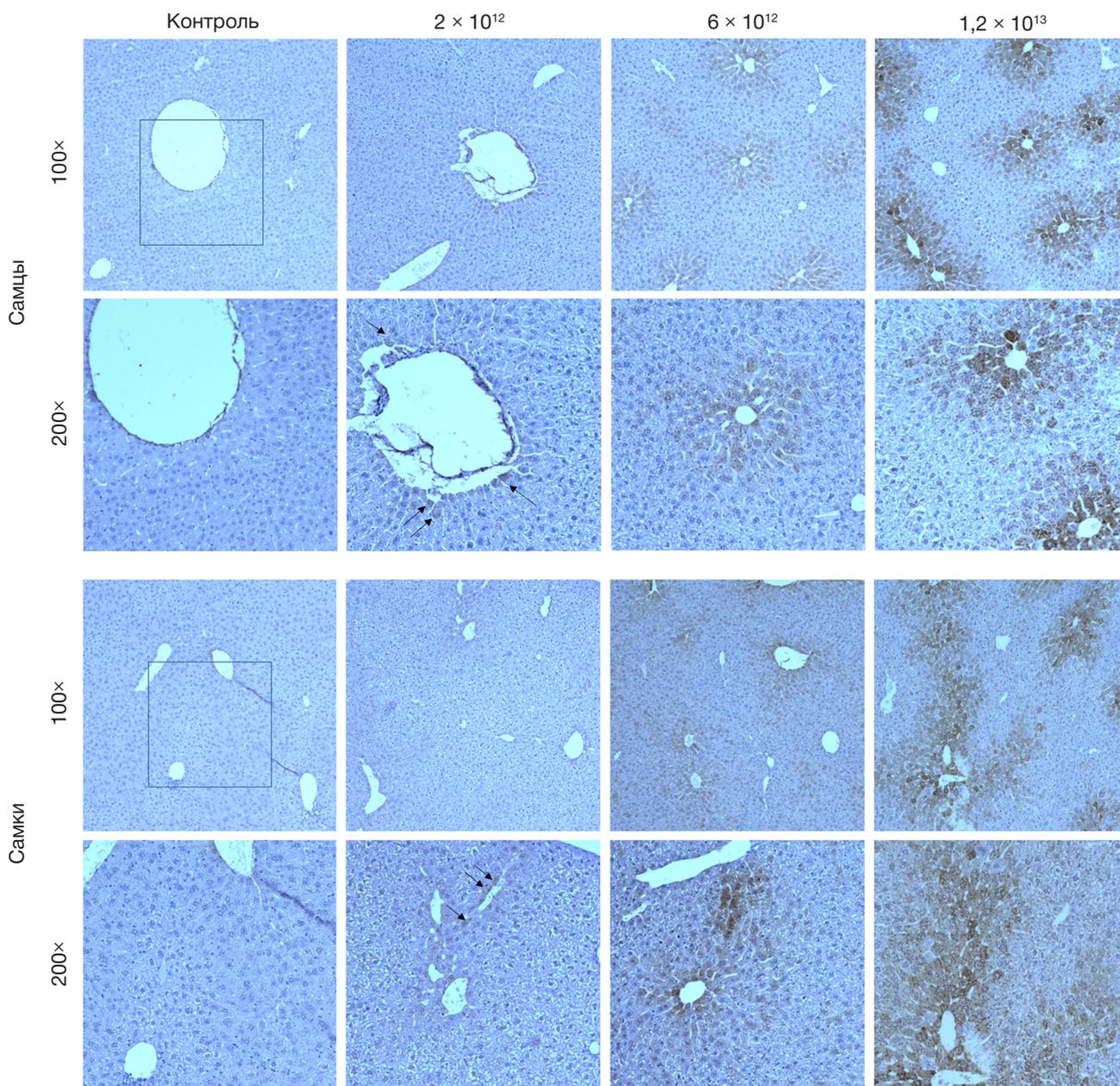
Оценку зависимости реакции от дозы проводили на мышах в возрасте 8 месяцев в группах  $n(C) = 11$ ,  $n(L) = 11$ ,  $n(M) = 11$ ,  $n(H) = 11$ . Исследования токсикологии и биораспределения включали мониторинг количества лейкоцитов и биохимических тестов на 3, 4 и 5 неделе после инфузии, а также посмертную оценку параметров крови и биораспределения препарата в мышцах и внутренних органах на 6-й неделе. Иммуногистохимическое исследование (ИГХ) показало селективное биораспределение кодирующей последовательности человеческого *UGT1A1* в печень. Сигнал h*UGT1A1* увеличивался вместе с дозой как по интенсивности, так и по распространению в паренхиме печени из вен долек (рис. 1).

Оценку токсичности передозировки максимальной потенциальной терапевтической дозой проводили путем введения дозы  $1,2 \times 10^{14}$  вг/кг 8-месячным мышам в контрольной и экспериментальной группах ( $n = 6$  в каждой) с теми же контрольными точками и контролируемыми параметрами, что и выше. Существенных токсических эффектов не было обнаружено. Оценку постепенного исчезновения конструкции в подростковом возрасте проводили на 5-недельных мышах ( $n = 24$ ), которым  $1,2 \times 10^{13}$  вг/кг препарата вводили в хвостовую вену. Через 2 недели после инфузии (и затем каждые 3 недели до конца эксперимента в возрасте 19 недель) группы мышей ( $n = 6, 4, 4, 4, 6$ ) подвергали эвтаназии и брали образцы печени для анализа копий вирусного генома методом количественной ПЦР и количественного обнаружения белка методом ИГХ (срезы печени, окрашенные антителом, специфичным к h*UGT1A1*). Результаты количественной ПЦР показали двукратное снижение содержания векторной ДНК каждые 6 недель (четырёхкратное за эксперимент). По результатам количественного анализа белка, уровень h*UGT1A1* увеличивался в течение 5 недель после инфузии и оставался стабильным до конца эксперимента.

### Пациент

Девочке с СКН1, подтвержденным секвенированием гена *UGT1A1* и проявляющимся тяжелой неконъюгированной гипербилирубинемией, находящейся под постоянным наблюдением в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России, проводили 12-часовую ежедневную фототерапию, что позволило удерживать уровень непрямого билирубина в пределах токсичности 300–350 мкмоль/л.

Терапия AAV была одобрена этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России 01 декабря 2022 г., протокол № 12 (для инфузии I), и 20 июля 2023 г., протокол № 7 (для инфузии II). Заявление на проведение клинического исследования I-II фазы № 13571. Законные представители пациентки дали информированное добровольное согласие на исследование и на каждую инфузию препарата.



**Рис. 1.** Результаты ИГХ для человеческой УДФ-глюкурозилтрансферазы 1A1 в печени мыши (6-я неделя после инфузии). Срезы, контрастно окрашенные гематоксилином, оценивали с использованием антител к человеческому UGT1A1, покрытых вторичным антителом, конъюгированным с HRP. Указаны дозы вектора, вг/кг. Черные стрелки на изображениях с низкой дозой указывают на периваскулярную локализацию сигнала

#### Лечение и результат

Терапия генопрепаратом была начата в возрасте 7 лет и 5 месяцев. Пациентке было проведено две внутривенные инфузии альфаглюкурозилтрансферазагена унопарвовета:  $6 \times 10^{12}$  вирусных геномов на кг массы тела (вг/кг) на 0-й неделе и  $1,2 \times 10^{13}$  вг/кг на 27-й неделе (рис. 2). Безопасность контролировали по уровням трансаминаз и самочувствию пациента. Эффективность оценивали по снижению уровня билирубина в сыворотке. Диаграмма уровней непрямого билирубина за 3,5 года, включая обширный период времени, предшествовавший лечению, представлена на рис. 2. Режим фототерапии постоянно корректировался в соответствии с уровнями непрямого билирубина. Обе инфузии сопровождались поддержкой преднизолоном для смягчения иммунных реакций: пациентка принимала преднизолон ежедневно перорально в дозах, постепенно снижаемых с 1 мг/кг

до 0 в течение 8 и 2 недель с момента первой и второй инфузии соответственно (рис. 2). Кроме того, в день инфузии II пациентка получила 250 мг (10 мг/кг) метилпреднизолона внутривенно.

Нейтрализующие антитела к AAV8 не были обнаружены до инфузии I. Положительная иммунологическая реакция с эпитопами AAV8 была выявлена после первой инфузии II и сохранялась в течение всего исследования.

Инфузия I снизила сывороточный билирубин в 2 раза (минимум, достигнутый на протяжении 2–9 недель). Поскольку ежедневные дозы фототерапии постепенно снижались до 4 ч к 8-й неделе, концентрация сывороточного билирубина восстановилась до  $\sim 250$  мкмоль/л (с 10-й недели и далее). Клиническое решение относительно инфузии II предполагало полную отмену фототерапии. Инфузия II на 27-й неделе не дала токсических эффектов и обеспечила дополнительное снижение концентрации сывороточного билирубина на  $\sim 20\%$  на 29-й неделе. В связи с положительной



**Рис. 2.** Динамика уровня непрямого билирубина в зависимости от первой и второй инфузий альфаглюкозилтрансферазаген унопарвовекта, скорректированных схем фототерапии и поддержки преднизолоном (пероральные дозы, начиная с 1 мг/кг в день)

динамикой поддержка фототерапией была прекращена, но возобновлена через 2 недели в той же ограниченной дозе 4 ч, поскольку концентрация сывороточного билирубина резко увеличилась до ~400 мкмоль/л. Повторная фототерапия обеспечила быструю коррекцию концентрации сывороточного билирубина до ~250 мкмоль/л. Профили печеночных ферментов оставались нормальными в течение всего периода наблюдения. На момент написания статьи (107-я неделя) пациент стабилен при фототерапии, проводимой по 4 ч в день, без системных жалоб.

### Обсуждение клинического случая

Лечение не вызвало токсических побочных эффектов. Хотя полное прекращение фототерапии оказалось невозможным

на данном этапе, лечение обеспечило длительное трехкратное снижение ежедневного воздействия ультрафиолета по сравнению с первоначальными значениями.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование печень-специфичной генной терапии у детей связано с ускоренной потерей эффекта, по-видимому, из-за высокой регенерационной способности и роста печени. Возможность безопасного повторного введения вектора AAV8 позволяет удовлетворительно контролировать критический биохимический показатель. Генная терапия СКН1 в настоящее время находится в фазе 1/2 испытания (<https://clinicaltrials.gov/study/NCT06641154>) и может быть применима к другим пациентам в возрасте от 3 месяцев до 10 лет.

### Литература

1. Dhawan A, Lawlor MW, Mazariegos GV, McKiernan P, Squires JE, Strauss KA, Gupta D, James E, Prasad S. Disease burden of Crigler-Najjar syndrome: Systematic review and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020; 35 (4): 530–43. DOI: 10.1111/jgh.14853.
2. Collaud F, Bortolussi G, Guianvarc'h L, et al. Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of
3. Greig JA, Nordin JML, Draper C, et al. AAV8 Gene Therapy Rescues the Newborn Phenotype of a Mouse Model of Crigler-Najjar. *Hum Gene Ther.* 2018; 29 (7): 763–70.
4. D'Antiga L, Beuers U, Ronzitti G, et al. Gene Therapy in Patients with the Crigler-Najjar Syndrome. *N Engl J Med.* 2023; 389 (7): 620–31. DOI: 10.1056/NEJMoa2214084.

### References

1. Dhawan A, Lawlor MW, Mazariegos GV, McKiernan P, Squires JE, Strauss KA, Gupta D, James E, Prasad S. Disease burden of Crigler-Najjar syndrome: Systematic review and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020; 35 (4): 530–43. DOI: 10.1111/jgh.14853.
2. Collaud F, Bortolussi G, Guianvarc'h L, et al. Preclinical Development of an AAV8-hUGT1A1 Vector for the Treatment of
3. Greig JA, Nordin JML, Draper C, et al. AAV8 Gene Therapy Rescues the Newborn Phenotype of a Mouse Model of Crigler-Najjar. *Hum Gene Ther.* 2018; 29 (7): 763–70.
4. D'Antiga L, Beuers U, Ronzitti G, et al. Gene Therapy in Patients with the Crigler-Najjar Syndrome. *N Engl J Med.* 2023; 389 (7): 620–31. DOI: 10.1056/NEJMoa2214084.