

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



ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ

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. Митулов, 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 <https://vestnik.rsmu.press/login?lang=ru>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@rsmu.press

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@rsmu.press

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2024: 0,7

Журнал включен в WoS. JIF 2024: 0,4

Индекс Хирша (h²) журнала по оценке Google Scholar: 11

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

SJR SCImago Journal & Country Rank 2024: 0,166

Журнал включен в DOAJ

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank

DOAJ

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2025-05

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

ISSN (Print): 2500-1094, ISSN (Online): 2542-1204.

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

Журнал индексируется в научных базах Scopus, Web of Science, Google Scholar, SJR, DOAJ, Scilit,

CyberLeninka, Embase, EZB, Lens.org, MITLibraries, OpenAlex, Research4Life, Scholia, Wikidata, ZDB.

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



Подписано в печать 31.10.2025

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

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL
RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

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

EDITORS Valentina Geidebrekht, PhD; Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina



SUBMISSION

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://vestnik.rsmu.press/login?lang=en>

CORRESPONDENCE editor@rsmu.press

COLLABORATION manager@rsmu.press

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2024: 0.7



Indexed in WoS. JIF 2024: 0.4



Five-year h-index is 11



SCImago Journal & Country Rank 2024: 0.166



Indexed in DOAJ



Open access to archive



Issue DOI: 10.24075/brsmu.2025-05

Mass media registration certificate No. 012769, issued on July 29, 1994.

ISSN (Print): 2500-1094, ISSN (Online): 2542-1204.

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

The journal is indexed in the following scientific databases: Scopus, Web of Science, Google Scholar, SJR, DOAJ, Scilit, CyberLeninka, Embase, EZB, Lens.org, MIT Libraries, OpenAlex, Research4Life, Scholia, Wikidata, and ZDB.

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



Approved for print 31.10.2025

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

5

Возрастные изменения в иммунной системе стареющих мышей

К. С. Матвеева, Д. В. Шевырев

Age-related alterations in the immune system of aging mice

Matveeva KS, Shevryev DV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

12

Панель IFN-I-индуцируемых генов при системной склеродермии: потенциал биомаркера стратификации

И. А. Шагина, М. А. Турчанинова, О. А. Головина, Л. С. Буфеева, Т. И. Журина, Р. Ф. Сайфуллин, М. Ю. Мышкин, З. Ю. Муговина, О. В. Британова

Panel of IFN-I-induced genes in systemic scleroderma: a stratification biomarker potential

Shagina IA, Turchaninova MA, Golovina OA, Bufeeva LS, Zhurina TI, Saifullin RF, Myshkin MYu, Mutovina ZYu, Britanova OV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

23

Изменения митохондриального и лизосомного компартментов в условиях химиоиндуцированной сенесценции

Р. О. Шаталова, Д. В. Шевырев

Alterations in mitochondrial and lysosomal compartments under chemotherapy-induced senescence

Shatalova RO, Shevryev DV

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

33

Морфологический, иммуногистохимический и молекулярный анализ дифференцированной высокозлокачественной карциномы

Д. Р. Махачев, Д. В. Буланов, М. М. Шовхалов, Б. З. Бекмурзиев, И. А. Героев, А. М. Нецветова, А. Р. Жусупова, Д. С. Губич, А. М. Мановски

Morphological, immunohistochemistry and molecular analysis of differentiated high-grade carcinoma

Makhachev DR, Bulanov DV, Shovkhalov MM, Bekmurziev BZ, Geroev IA, Netsvetova AM, Zhusupova AR, Gubich DS, Manovski AM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

39

Реанимация радиоиммунологического метода определения аутоантител к инсулину

А. В. Тимофеев, Р. Р. Галимов, Е. А. Колесникова, А. С. Артюхов, Ю. С. Скоблов, С. В. Тактаров

Revival of radioimmunoassay for determination of insulin autoantibodies

Timofeev AV, Galimov RR, Kolesnikova EA, Artyuhov AS, Skoblov YuS, Taktarov SV

МНЕНИЕ

45

Перспективы поиска патогенетически обоснованной терапии эпилепсии, ассоциированной с глиомой головного мозга

Т. И. Ашхатава, В. А. Калинин, А. В. Якунина, И. Е. Повереннова

Prospects of finding pathologically based therapies for epilepsy associated with brain glioma

Ashkhatsava TI, Kalinin VA, Yakunina AV, Poverennova IE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

49

Особенности транскриптомного профиля FAP⁺-клеток в опухолях молочной железы различных молекулярно-биологических подтипов

А. Ю. Калинин, И. А. Пацкан, М. М. Штадельман, Е. С. Григорьева, Л. А. Таширева

Transcriptomic features of FAP⁺ cells across molecular subtypes of breast cancer

Kalinchuk AYU, Patskan IA, Stadelman MM, Grigorieva ES, Tashireva LA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

57

Оптимизация условий культивирования В-клеток человека для экспансии активированных или дифференцированных В-клеток

С. Р. Соколова, И. Л. Григорова

Optimization of human B cell culture conditions for expansion of activated or differentiated B cells

Sokolova SR, Grigorova IL

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

68

Сравнительный анализ конструкций металлических каркасов эндоваскулярных спиралей

Е. В. Чепелева, К. В. Козырь, В. П. Бородин, В. В. Хахалкин, С. В. Владимиров, М. А. Махмудов, А. Г. Бадоян, А. А. Баранов, О. В. Крестьянинов

Comparative analysis of metallic endovascular coil frame designs

Chepeleva EV, Kozyr KV, Borodin VP, Khakhalkin VV, Vladimirov SV, Makhmudov MA, Badoian AG, Baranov AA, Krestyaninov OV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

78

Цитосовместимость свободноспеченной пористой В₄С-керамики при исследовании *in vitro*

Е. В. Чепелева, К. В. Козырь, А. А. Вавер, В. В. Хахалкин

Cytocompatibility of pressureless sintered porous В₄С-ceramics assessed *in vitro*

Chepeleva EV, Kozyr KV, Vaver AA, Khakhalkin VV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

86

Чувствительность к бедаквилину нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих на территории России

Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская, Е. Е. Ларионова, А. С. Зайцева, Е. А. Киселева, В. В. Устинова, Л. Н. Черноусова, А. Э. Эргешов

Susceptibility of the nontuberculous mycobacteria circulating in Russia to bedaquiline

Smirnova TG, Andreevskaya SN, Larioнова EE, Zaytseva AS, Kiseleva EA, Ustinova VV, Chernousova LN, Ergeshov AE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

91

Нейрофизиологические маркеры иллюзии, вызванной зеркальной визуальной обратной связью

О. А. Мокиенко, П. Д. Бобров, А. А. Соловьева, М. Р. Исаев, Я. В. Керечанин, В. Ю. Ратникова, В. А. Катайцев, Е. Д. Шагина, В. Б. Никишина

Neurophysiological markers of the illusion caused by the mirror visual feedback

Mokienko OA, Bobrov PD, Soloveva AA, Isaev MR, Kerechanin YaV, Ratnikova VYu, Kataitsev VA, Shagina ED, Nikishina VB

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

100

Молекулярно-цитогенетическая характеристика редкого случая рекомбинантной хромосомы 22 вследствие материнской интрахромосомной инсерции

Д. А. Юрченко, Ж. Г. Маркова, М. С. Петухова, Г. Н. Матющенко, Н. В. Шилова

Molecular cytogenetic characterization of a rare recombinant chromosome 22 caused by a maternal intrachromosomal insertion

Yurchenko DA, Markova ZhG, Petukhova MS, Matyushchenko GN, Shilova NV

МНЕНИЕ

108

В медицине следует избегать терминов «доминантный» и «рецессивный» из-за развития генной терапии

А. М. Гамисония, Д. В. Ребриков

The terms "dominant" and "recessive" should be avoided due to gene therapy

Gamisonia AM, Rebrikov DV

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ИММУННОЙ СИСТЕМЕ СТАРЕЮЩИХ МЫШЕЙ

К. С. Матвеева, Д. В. Шевырев ✉

Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Накопление сенесцентных клеток в тканях связано с функциональным ухудшением и развитием возраст-ассоциированных патологий. Ключевую роль в этом процессе играет сенесцент-ассоциированный секреторный фенотип (SASP), способствующий хроническому вялотекущему системному воспалению, которое ассоциировано с повышенным риском аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также снижением устойчивости к инфекциям. В норме иммунная система удаляет сенесцентные клетки, однако с возрастом эффективность этого процесса падает, в том числе по причине старения иммунной системы. Целью исследования было изучить возрастные изменения в основных популяциях лимфоцитов и миелоцитов в образцах селезенки и костного мозга мышей преклонного возраста. Исследование проводили на группах молодых ($n = 8$) и пожилых ($n = 4$) мышей линии C57BL/6. Анализ популяций проводили с использованием флуоресцентно-меченых антител методом проточной цитометрии. Фенотип старения оценивали по активности фермента β -Gal с предварительной обработкой бафиломицином A1, который обеспечивает защелачивание лизосом и позволяет выявить повышенную активность фермента, типичную для стареющих клеток (SA- β -Gal). В результате у пожилых мышей было выявлено значимое повышение содержания миелоидных популяций, CD11c⁺B-клеток, дважды негативных T-лимфоцитов, а также снижение CD8 α^+ дендритных клеток. Кроме того, при старении значимо возрастало содержание клеток позитивных по SA- β -Gal, особенно в популяциях миелоидных клеток. Полученные данные указывают, что возрастные изменения носят системный характер и отражают так называемый миелоидный сдвиг, а также накопление провоспалительных популяций в миелоидном и лимфоидном компартаментах.

Ключевые слова: старение, сенесцентность, старение иммунной системы, β -галактозидаза, SA- β -Gal, лимфоциты, миелоциты, мыши

Финансирование: данная работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект № 24-15-20003 <https://rscf.ru/project/24-15-20003/> (дата доступа 19 августа 2025 г.).

Вклад авторов: К. С. Матвеева — проведение экспериментов, обработка данных, оформление рукописи, Д. В. Шевырев — проведение экспериментов, статистический анализ, рецензирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Университета «Сириус» (протокол № 7.1 от 12 апреля 2024 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Даниил Вадимович Шевырев
Олимпийский проспект, д. 1, г. Сочи, 354349, Россия; dr.daniil25@mail.ru

Статья получена: 27.08.2025 **Статья принята к печати:** 23.09.2025 **Опубликована онлайн:** 30.09.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.043

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/>).

AGE-RELATED ALTERATIONS IN THE IMMUNE SYSTEM OF AGING MICE

Matveeva KS, Shevyrev DV ✉

Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodarsky Krai, Russia

Accumulation of senescent cells in the tissues is associated with functional impairment and the development of age-related disorders. The key role in this process is played by the senescence-associated secretory phenotype (SASP) contributing to chronic systemic inflammation, which is associated with the increased risk of autoimmune disorders and cancer, as well as the decreased resistance to infections. Normally, the immune system eliminates senescent cells, but the effectiveness of this process decreases with age, including due to the immune system aging. The study aimed to assess age-related alterations in the main lymphocyte and myelocyte populations in the spleen and bone marrow samples of senile mice. The study involved groups of young ($n = 8$) and elderly ($n = 4$) C57BL/6 mice. Populations were tested by flow cytometry using the fluorescence-labeled antibodies. The aging phenotype was assessed based on the β -Gal enzyme activity with pre-treatment with bafilomycin A1, ensuring lysosomal alkalization and allowing one to detect the increased enzyme activity typical for the aging cells (SA- β -Gal). As a result, the significantly increased levels of myeloid populations, CD11c⁺ B cells, double-negative T cells, along with the decreased levels of the CD8 α^+ dendritic cells, were reported in elderly mice. Furthermore, aging was associated with the significant increase in the levels of SA- β -Gal-positive cells, especially in the populations of myeloid cells. The data obtained suggest that the age-related alterations are of systemic nature and reflect the so-called myeloid shift, as well as accumulation of pro-inflammatory populations in the myeloid and lymphoid compartments.

Keywords: aging, senescence, immune system aging, β -galactosidase, SA- β -Gal, lymphocytes, myelocytes, mice

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation работа, project No. 24-15-20003 <https://rscf.ru/project/24-15-20003/> (date of access: August 19, 2025).

Author contribution: Matveeva KS — experimental procedure, data processing, manuscript formatting, Shevyrev DV — experimental procedure, statistical analysis, manuscript reviewing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Sirius University of Science and Technology (protocol No. 7.1 dated 12 April 2024).

✉ **Correspondence should be addressed:** Daniil V. Shevyrev
Olimpiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354349, Russia; dr.daniil25@mail.ru

Received: 27.08.2025 **Accepted:** 23.09.2025 **Published online:** 30.09.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.043

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/>).

Клеточное старение — это сложный многокомпонентный процесс, триггером которого выступают различные стрессы: повреждения ДНК, укорочение теломер, активация ретроэлементов, окислительный и механический стрессы, а также неблагоприятные физические, химические и биологические факторы [1, 2]. Накопление мутаций и различных повреждений в стареющих клетках повышает риск опухолевой трансформации. В настоящее время считается, что одним из механизмов противоопухолевой защиты является переход в состояние сенесцентности [3, 4]. В целом сенесцентность реализуется через конвергенцию нескольких сигнальных каскадов, главными из которых являются p53/p21CIP1 и p16INK4a/RB [5]. Эти пути активируются в ответ на укорочение теломер и повреждение ДНК (DNA damage response, или DDR), активацию онкогенов, эпигенетические нарушения, нарушения архитектуры хроматина, избыток реактивных форм кислорода, в результате дисфункции органелл (в первую очередь митохондрий), а также в ответ на некоторые воспалительные и паракринные сигналы [6, 7]. Стресс-индуцированная активация NF- κ B и mTOR путей приводит к продукции широкого спектра провоспалительных субстанций сенесцентными клетками (SASP) и нарушению аутофагии [8, 9]. А сопостствующая активация белков BCL-2, BCL-XL и MCL-1 блокирует апоптоз [10]. Эти изменения определяют ключевые особенности сенесцентных клеток, такие как перманентная остановка клеточного цикла, устойчивость к апоптозу, воспалительный фенотип SASP, дисфункции митохондрий и нарушения протеостаза [11]. Морфофункциональным отражением метаболического дисбаланса и лизосомной дисфункции сенесцентных клеток является гипертрофия лизосомного аппарата и повышение активности фермента лизосом — β -галактозидазы (β -Gal) [12]. Таким образом, высокое содержание фермента в увеличенных лизосомах приводит к детектируемой активности β -галактозидазы в неоптимальном диапазоне pH = 6,0, что позволяет использовать этот фермент в качестве маркера сенесцентных клеток (SA- β -Gal) [13, 14]. Обычно для определения активности β -Gal используют хромогенные субстраты, которые не подходят для многопараметрического фенотипического анализа сенесцентных клеток флуоресцентными методами, включая проточную цитометрию. Появление флуорогенного субстрата β -Gal значительно расширяет область применения этого маркера и позволяет одновременно оценивать активность SA- β -Gal в разных клеточных популяциях методом проточной цитометрии [15]. В настоящее время мало данных об изменении активности данного фермента в различных популяциях клеток иммунной системы при старении. Оценка активности SA- β -Gal в различных лимфоидных и миелоидных популяциях центрального и периферического отделов иммунной системы представляет интерес в контексте изучения возрастных изменений в иммунной системе. Поскольку иммунная система в течение жизни подвергается воздействию различных по природе и интенсивности стрессовых факторов, отдельные субпопуляции лимфоидных и миелоидных клеток будут иметь неодинаковые траектории и темпы старения. Увеличение сенесцентного бремени в иммунной системе усугубляет «inflammaging», повышает риск развития аутоиммунных и онкологических процессов, а также увеличивает восприимчивость к инфекциям [16]. Поэтому детальное изучение возрастных изменений в иммунной системе закладывает фундамент для разработки

направленных подходов восстановления компетентности иммунной системы в пожилом возрасте. Таким образом, целью данной работы было проведение сравнительного анализа активности SA- β -Gal в основных популяциях клеток иммунной системы, полученных из селезенки и костного мозга мышей молодого (3 месяца) и крайне пожилого возраста (26 месяцев). Такой подход позволил изучить распределение клеток с признаками старения в иммунной системе пожилых мышей, а также сравнить центральный и периферический отделы иммунной системы по содержанию таких клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Мыши

Исследование проводили на 12 мышах линии C57BL/6: 8 мышах в возрасте 3 месяца и 4 пожилых мышах в возрасте 26 месяцев. Животных содержали в виварии с 12-часовым световым циклом, свободным доступом к воде и сбалансированному лабораторному корму. Эвтаназию проводили с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, в условиях глубокой анестезии изофлураном методом цервикальной дислокации. Сразу после эвтаназии проводили сбор необходимых материалов.

Выделение спленоцитов

После эвтаназии извлекали селезенку, помещали в стеклянный гомогенизатор с холодным PBS (1% FCS, 0,02% EDTA) и мягко растирали стеклянным пестиком до получения однородной суспензии. Полученную клеточную взвесь дважды фильтровали через нейлоновый фильтр (70 мкм), промывая раствором PBS. Фильтрат центрифугировали 5 мин — 300 g при 8 °C. Осадок ресуспендировали в 5 мл буфера для лизиса эритроцитов в течение 2 мин. Затем добавляли 10 мл PBS с 1% FBS и повторно центрифугировали. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в нужной концентрации в полной среде RPMI-1640 или PBS в зависимости от целей.

Выделение клеток костного мозга

Клетки костного мозга выделяли из бедренных и большеберцовых костей мыши путем вымывания костного мозга раствором PBS из полости кости с помощью шприца (27 G). Полученную суспензию дважды фильтровали через нейлоновый фильтр 70 мкм, отмывали в растворе PBS (0,02% EDTA) центрифугированием 5 мин — 300 g при 8 °C. Далее проводили лизис эритроцитов (см. выше) и ресуспендировали в полной среде или PBS.

Жизнеспособность спленоцитов и клеток костного мозга оценивали флуоресцентным методом с помощью акридинового оранжевого и пропидия йодида и составляла в среднем 98%.

Окрашивание SA- β -Gal

Для оценки активности SA- β -Gal в живых клетках использовали витальный краситель SPIDER- β Gal (Cellular Senescence Detection Kit, Dojindo Laboratories, Japan), который является флуорогенным субстратом, специфичным для β -Gal. Клетки костного мозга или спленоциты в количестве 2×10^5 клеток на лунку инкубировали в 96-луночном

плоскодонном планшете (NEST Biotechnologies, Китай) в полной среде RPMI-1640 в объеме 200 мкл с добавлением бафиломицина A1 (Sigma Aldrich, США) в конечной концентрации 100 нМ в качестве агента, защелачивающего лизосомы, в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Далее к клеткам добавляли субстрат в конечной концентрации 1 мкмоль/л и инкубировали при тех же условиях в течение 1 ч. Затем клетки отмывали центрифугированием 5 мин — 300 g, 20 °С), окрашивали красителем FVS780 (BD Biosciences, США) согласно протоколу производителя для удаления из последующего анализа мертвых клеток и метили антителами. В качестве положительного контроля клетки параллельно инкубировали с субстратом без добавления бафиломицина. В качестве негативного контроля клетки инкубировали с добавлением бафиломицина и без добавления субстрата.

Фенотипирование

Для окрашивания антителами 2×10^5 клеток ресуспендировали в 200 мкл FACS-буфера, добавляли 50 мкл смеси антител, тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали при 4 °С — 30 мин в темноте. Используемые против мыши антитела: TCR β BV700 (#745846, BD Biosciences, США), CD19 BV605 (#563148, BD Biosciences, США), CD11c APC (#550261, BD Biosciences, США), CD11b BV510 (#562950, BD Biosciences, США), Ly6G PE (#12-9668-82, ThermoFisher, США), Ly6C PE-Cy7 (#560593, BD Biosciences, США), CD4 SB702 (#67-0041-82, ThermoFisher, США), CD8 SB780 (#78-0081-82, ThermoFisher, США). Затем клетки дважды отмывали 5 мин — 300 g FACS-буфером и ресуспендировали в объеме 300 мкл. Далее их анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa (BD Biosciences, США).

Статистический анализ

Анализ данных проточной цитометрии проводили с использованием программы FlowJo 10.8.1. (BD Bioscience, США). Статистический анализ — в программе GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, США). Распределения проверяли на нормальность с помощью теста Шапиро–Уилка. Сравнение групп молодых и пожилых мышей проводили с помощью непараметрического теста Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использование многоцветной проточной цитометрии позволило изучить активность SA- β -Gal в десяти различных популяциях клеток иммунной системы. Анализируемые популяции были условно разделены по происхождению на лимфоидные (T- and B-cells) и миелоидные (конвенциональные дендритные клетки, моноциты, макрофаги и гранулоциты). Стратегия гейтирования представлена на рис. 1А. Затем в каждой из обозначенных популяций оценивали долю клеток с повышенной активностью SA- β -Gal. Границу гейта определяли по контролю FMO (от англ. fluorescence minus one), в качестве которого выступали клетки без добавления флуорогенного субстрата SPiDER- β Gal, но с добавлением бафиломицина A1 (рис. 1Б). Последнее особенно важно для контрольных образцов, так как бафиломицин A1 сам по себе влияет на уровень аутофлуоресценции клеток.

При анализе данных, полученных из селезенки мышей, мы выявили значимое повышение содержания моноцитов (8,2% (5,6–12,4) против 23,7% (17,3–29,2), $p < 0,05$), дендритных клеток (12,9% (12–14,2) против 27,9% (18,2–29,5), $p < 0,05$) и В-лимфоцитов (53,5%

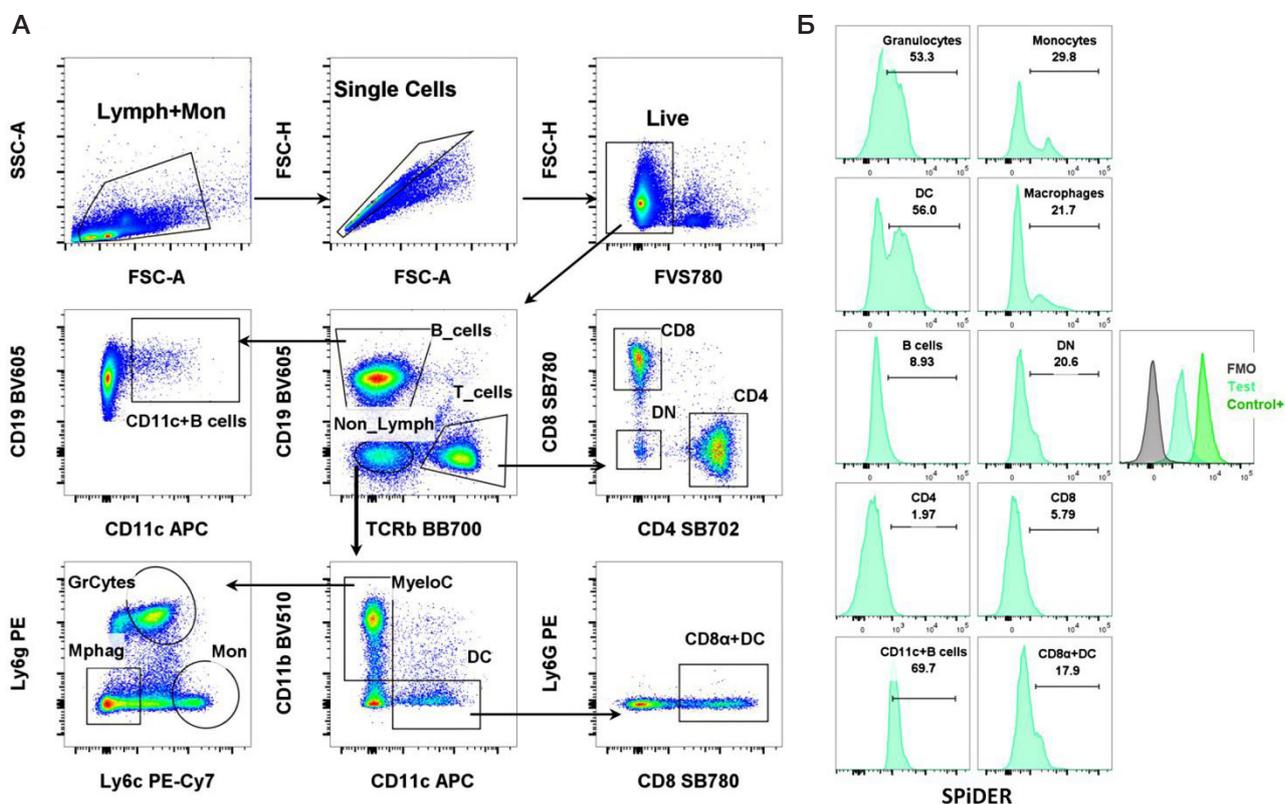


Рис. 1. Стратегии гейтирования лимфоидных и миелоидных популяций в образцах селезенки и костного мозга мышей (А) и оценки доли положительных по SA- β -Gal клеток в каждой анализируемой популяции (Б). Справа представлена гистограмма, отражающая уровень флуоресценции SPiDER в канале 488-530/30 в FMO-контроле без добавления субстрата и в положительном контроле Control+ без добавления бафиломицина A1

(49,8–57,5) против 66,4% (64,9–69,5), $p < 0,05$) в группе пожилых мышей (рис. 2А). Интересно отметить, что с возрастом значительно увеличивалось содержание CD11c⁺В-клеток (0,39% (0,32–0,47) против 2,18% (1,33–2,58), $p < 0,01$) — это относительно недавно описанная популяция В-клеток, ассоциированных со старением. Также, несмотря на увеличение общей популяции дендритных клеток, содержание CD8 α ⁺DC значительно снижалось (31,9% (29–33) против 23,8% (19,3–31,2), $p < 0,01$). В образцах костного мозга тоже наблюдалось увеличение содержания моноцитов (18,2% (14–20) против 23,7% (22–28,2), $p < 0,05$) и снижение содержания В-клеток (32,9% (29,9–36,3) против 26,2% (22,8–27,5), $p < 0,05$) при этом содержание CD11c⁺В-клеток возрастало (0,03% (0,025–0,048) против 0,26% (0,18–0,4), $p < 0,01$), а CD8 α ⁺DC снижалось (21,6% (19,1–24) против 6,5% (4,9–7,1), $p < 0,01$) — аналогично образцам селезенки (рис. 2Б).

На следующем этапе изучали распределение клеток с повышенной активностью SA- β -Gal среди лимфоидных и миелоидных популяций. В образцах селезенки было выявлено значительное повышение содержания позитивных по SA- β -Gal гранулоцитов (7,2% (2,4–15,5) против 62,5% (45,8–66,1), $p < 0,001$), макрофагов (23,8% (16,8–29,1) против 57,2% (55,1–63,5), $p < 0,001$) и моноцитов (50,5% (43,8–86) против 85,1% (77,7–90,2), $p < 0,01$), а также CD11c⁺В-лимфоцитов (39,2% (35,4–43) против 60,5% (57,5–73,3), $p < 0,01$) в группе пожилых мышей (рис. 2В). В костном мозге выявлено возрастное увеличение SA- β -Gal позитивных макрофагов (64,4% (56,8–65,8) против 70,9% (66,1–76,5), $p < 0,05$), CD8 α ⁺DC (1,5% (0,96–1,7) против 3,25% (2,71–4,26), $p < 0,05$), дважды негативных лимфоцитов (19,5% (15,2–28,3) против 41% (30,9–53,3), $p < 0,05$) и CD11c⁺В-клеток (38,4% (34,2–43,6) против 62% (47,8–76,8), $p < 0,05$) (рис. 2Г).

Таким образом, в результате исследования были выявлены возрастные изменения в основных популяциях лимфоидных и миелоидных клеток, которые сопровождалась увеличением доли клеток с повышенной активностью SA- β -Gal. В костном мозге, как в первичном лимфоидном органе, эти изменения были выражены менее существенно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показали, что физиологическое старение иммунной системы происходит неравномерно [17] и сопровождается значимыми количественными изменениями в популяциях В-лимфоцитов, дендритных клеток и моноцитов. Кроме того, в популяциях миелоидной линии накопление клеток с повышенной активностью SA- β -Gal происходит быстрее, чем в лимфоидном компартменте.

Увеличение содержания В-клеток в селезенке пожилых мышей может отражать историю антигенных вызовов в течение жизни, а накопление возраст-ассоциированных CD11c⁺В-клеток связывают со старением и повышением риска аутоиммунных заболеваний и феноменом «inflammaging» [18, 19]. Это клетки с нарушенными функциями, которые способствуют приобретению макрофагами провоспалительного фенотипа, их содержание часто повышено при различных аутоиммунных заболеваниях, и они могут составлять значительную часть популяции зрелых В-клеток в пожилом организме [20].

В костном мозге наоборот наблюдалось снижение содержания В-клеток, что отражает возрастное снижение их продукции и, по-видимому, негативно влияет на способность иммунной системы отвечать на новые антигенные вызовы [21]. При этом, несмотря

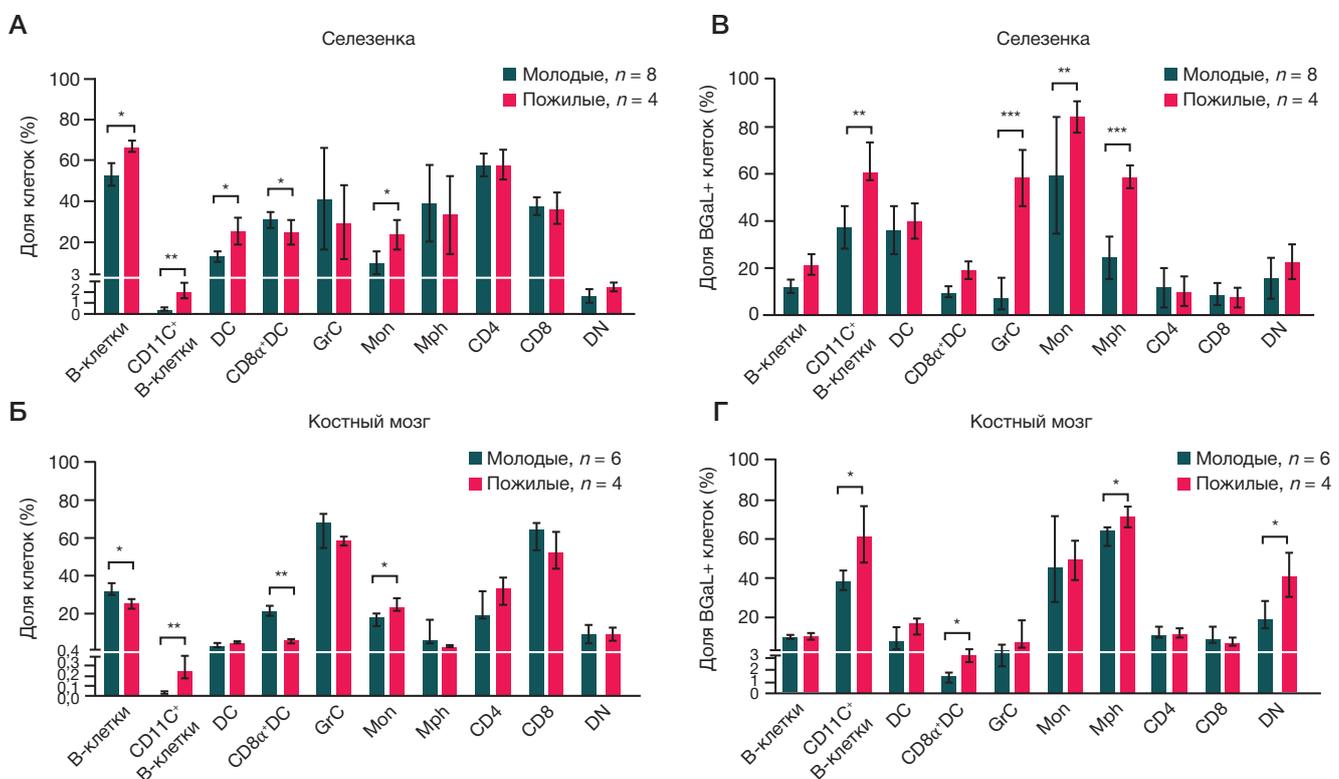


Рис. 2. Содержание лимфоидных и миелоидных популяций в образцах селезенки (А) и костного мозга (Б), а также анализ содержания клеток с признаками сенесцентности позитивных по маркеру SA- β -Gal в образцах селезенки (В) и костного мозга (Г). DC — дендритные клетки, GrC — гранулоциты, Mon — моноциты, Mph — макрофаги, DN — дважды негативные Т-клетки. Сравнение групп проводили методом Манна-Уитни. Данные представлены в виде Me \pm IQR; * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$

на уменьшение общей популяции В-лимфоцитов, содержание CD11c⁺В-клеток было повышено, как и в селезенке. Возрастное увеличение содержания CD11c⁺ дендритных клеток в селезенке, а моноцитов и в костном мозге, по-видимому, отражает так называемый «миелоидный сдвиг» — характерную особенность старения иммунной системы, которая хорошо описана в недавних исследованиях [22–24]. Особый интерес представляет выявленное увеличение доли SA-β-Gal-позитивных гранулоцитов, моноцитов и макрофагов в селезенках пожилых мышей. Возрастное накопление SA-β-Gal-позитивных клеток в миелоидных популяциях, по-видимому, вносит вклад в хроническое вялотекущее воспаление — *inflammaging*, которое преимущественно обусловлено продукцией факторов SASP сенесцентными миелоидными клетками [25, 26]. Повышенное содержание SA-β-Gal-позитивных макрофагов, DN Т-лимфоцитов и, особенно, CD11c⁺В-клеток в костном мозге указывает на вовлечение центральных отделов иммунной системы в процессы старения. В этом контексте стоит отметить, что непосредственная близость стареющих макрофагов и CD11c⁺В-клеток к гемопоэтическим стволовым клеткам (HSC) может негативно влиять на микроокружение в нишах за счет продукции факторов SASP и приводить к функциональному истощению и снижению лимфопоэтического потенциала HSC [27]. Так может замыкаться порочный круг, когда накопление клеток с признаками сенесцентности в костном мозге негативно влияет на гемопоэз, что в свою очередь усиливает накопление дисфункциональных и стареющих клеток [28].

Мы обнаружили существенное повышение активности SA-β-Gal в различных лимфоидных и миелоидных популяциях в группе пожилых мышей, что наряду с существующими данными позволяет использовать этот маркер в контексте изучения процессов старения иммунной системы. Тем не менее, стоит отметить определенные ограничения нашего исследования. Полученные данные основаны на оценке активности SA-β-Gal как основного маркера клеточной сенесцентности, однако этот маркер не является абсолютно специфичным и может повышаться при активации и изменении метаболизма в некоторых типах клеток, а также на этапе перехода клеток в сенесцентное состояние [29, 30]. Кроме того, нами не проводилась оценка функционального потенциала изучаемых популяций и не использовались дополнительные маркеры сенесцентности, такие как p16INK4a, p21CIP1, HMGB1 [5] или компоненты SASP [31], что ограничивает интерпретацию наблюдаемых явлений исключительно в контексте клеточной сенесцентности.

Однако старение это сложный и многогранный процесс, который не ограничивается одним переходом клеток в сенесцентное состояние. Так, выявленные нами количественные изменения в содержании лимфоидных и миелоидных субпопуляций в группе пожилых мышей, наряду с изменениями в активности SA-β-Gal, по-видимому, отражают наиболее выраженные возрастные изменения в иммунной системе. Поэтому необходимы дальнейшие комплексные исследования, включающие анализ транскриптома и протеома, а также функциональные тесты, направленные на изучение различных аспектов старения иммунной системы. Такой подход будет способствовать более глубокому пониманию механизмов иммунного старения и созданию стратегий, направленных на восстановление компетентности иммунной системы в пожилом возрасте.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты подтверждают гипотезу о неравномерном старении различных компонентов иммунной системы и указывают на миелоидный сдвиг как на ключевую особенность старения иммунной системы. Стоит также отметить, что возрастные изменения помимо периферического отдела наблюдались и в костном мозге. Так, снижение содержания В-клеток отражает возрастное угнетение продукции В-лимфоцитов, а значительное повышение содержания провоспалительных CD11c⁺В-клеток и позитивных по SA-β-Gal DN Т-лимфоцитов, макрофагов и CD8α⁺-дендритных клеток свидетельствует о вовлечении центральных отделов иммунной системы в процессы старения [27]. Необходимо подчеркнуть, что накопление SA-β-Gal-позитивных клеток происходит в костном мозге в непосредственной близости от гемопоэтических стволовых клеток, где продукция факторов SASP может нарушать функциональное состояние ниш, снижать лимфопоэтический потенциал и тем самым замыкать порочный круг возраст-ассоциированной дисфункции иммунной системы [27, 28]. Эти данные дополняют современные представления о динамических изменениях в иммунной системе, которые происходят при старении. Таким образом, дальнейшее изучение возрастных изменений в иммунной системе с применением комплекса методов, включая оценку SA-β-Gal, имеет практическую значимость с точки зрения разработки подходов селективного удаления воспалительных сенесцентных клеток, восстановления лимфопоэтического потенциала и улучшения функциональной активности иммунной системы в пожилом возрасте.

Литература

1. Ajoalabady A, Pratico D, Bahijri S, Tuomilehto J, Uversky VN, Ren J. Hallmarks of cellular senescence: biology, mechanisms, regulations. *Exp Mol Med*. 2025; 57 (7): 1482–91. DOI: 10.1038/s12276-025-01480-7. Epub 2025 Jul 10. PMID: 40634753; PMCID: PMC12322015.
2. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9: 645593. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593. PMID: 33855023; PMCID: PMC8039141.
3. Hornsby PJ. Senescence as an anticancer mechanism. *J Clin Oncol*. 2007; 25 (14): 1852–7. DOI: 10.1200/JCO.2006.10.3101. PMID: 17488983.
4. Baz-Martínez M, Da Silva-Álvarez S, Rodríguez E, Guerra J, El Motiam A, et al. Cell senescence is an antiviral defense mechanism. *Sci Rep*. 2016; 6: 37007. DOI: 10.1038/srep37007. PMID: 27849057; PMCID: PMC5111111.
5. Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaître JM. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun*. 2011; 2: 473. DOI: 10.1038/ncomms1473. PMID: 21915115.
6. Dasgupta N, Arnold R, Equey A, Gandhi A, Adams PD. The role of the dynamic epigenetic landscape in senescence: orchestrating SASP expression. *NPJ Aging*. 2024; 10 (1): 48. DOI: 10.1038/s41514-024-00172-2. PMID: 39448585; PMCID:

- PMC11502686.
7. Miwa S, Kashyap S, Chini E, von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J Clin Invest.* 2022; 132 (13): e158447. DOI: 10.1172/JCI158447. PMID: 35775483; PMCID: PMC9246372.
 8. Kwon Y, Kim JW, Jeoung JA, Kim MS, Kang C. Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Mol Cells.* 2017; 40 (9): 607–12. DOI: 10.14348/molcells.2017.0151. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28927262; PMCID: PMC5638768.
 9. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B in Aging and Disease. *Aging Dis.* 2011; 2 (6): 449–65. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22396894; PMCID: PMC3295063.
 10. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun.* 2016; 7: 11190. DOI: 10.1038/ncomms11190. PMID: 27048913; PMCID: PMC4823827.
 11. Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb).* 2019; 29 (3): 030501. DOI: 10.11613/BM.2019.030501. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31379458; PMCID: PMC6610675.
 12. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009; 4 (12): 1798–806. DOI: 10.1038/nprot.2009.191. PMID: 20010931.
 13. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92 (20): 9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. PMID: 7568133; PMCID: PMC40985.
 14. Yegorov YE, Akimov SS, Hass R, Zelenin AV, Prudovsky IA. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Exp Cell Res.* 1998; 243 (1): 207–11. DOI: 10.1006/excr.1998.4169. PMID: 9716464.
 15. Doura T, Kamiya M, Obata F, Yamaguchi Y, Hiyama TY, Matsuda T, et al. Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016 Aug 8; 55(33):9620–4. DOI: 10.1002/anie.201603328. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27400827.
 16. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 14 (10): 576–90. DOI: 10.1038/s41574-018-0059-4. PMID: 30046148.
 17. Liu Z, Liang Q, Ren Y, Guo C, Ge X, Wang L, et al. Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8 (1): 200. DOI: 10.1038/s41392-023-01451-2. PMID: 37179335; PMCID: PMC10182360.
 18. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev.* 2011; 10 (3): 330–5. DOI: 10.1016/j.arr.2010.08.004. Epub 2010 Aug 20. PMID: 20728581; PMCID: PMC3040253.
 19. Carey A, Nguyen K, Kandikonda P, Bradley C, Dahlquist KJV, et al. Age-associated accumulation of B cells promotes macrophage inflammation and inhibits lipolysis in adipose tissue during sepsis. *Cell Rep.* 2024; 43 (3): 113967. DOI: 10.1016/j.celrep.2024.113967. Epub 2024 Mar 15. PMID: 38492219; PMCID: PMC11014686.
 20. Mouat IC, Goldberg E, Horwitz MS. Age-associated B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2022; 79 (8): 402. DOI: 10.1007/s00018-022-04433-9. PMID: 35798993; PMCID: PMC9263041.
 21. Zharhary D. Age-related changes in the capability of the bone marrow to generate B cells. *J Immunol.* 1988; 141 (6): 1863–9. PMID: 3262642.
 22. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 (50): 20012–7. DOI: 10.1073/pnas.1116110108. Epub 2011 Nov 28. PMID: 22123971; PMCID: PMC3250139.
 23. Yamamoto R, Nakauchi H. In vivo clonal analysis of aging hematopoietic stem cells. *Mech Ageing Dev.* 2020; 192: 111378. DOI: 10.1016/j.mad.2020.111378. Epub 2020 Oct 3. PMID: 33022333; PMCID: PMC7686268.
 24. Ross JB, Myers LM, Noh JJ, Collins MM, Carmody AB, Messer RJ, et al. Depleting myeloid-biased hematopoietic stem cells rejuvenates aged immunity. *Nature.* 2024; 628 (8006): 162–170. DOI: 10.1038/s41586-024-07238-x. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38538791; PMCID: PMC11870232.
 25. Kovtonyuk LV, Fritsch K, Feng X, Manz MG, Takizawa H. Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Front Immunol.* 2016; 7: 502. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00502. PMID: 27895645; PMCID: PMC5107568.
 26. Blevie A, Motta F, Durante B, Pandolfo C, Selmi C, Sica A. Immunosenescence, Inflammaging, and Frailty: Role of Myeloid Cells in Age-Related Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2023; 64 (2): 123–44. DOI: 10.1007/s12016-021-08909-7. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35031957; PMCID: PMC8760106.
 27. Pappert M, Khosla S, Doolittle M. Influences of Aged Bone Marrow Macrophages on Skeletal Health and Senescence. *Curr Osteoporos Rep.* 2023; 21 (6): 771–78. DOI: 10.1007/s11914-023-00820-8. Epub 2023 Sep 9. PMID: 37688671; PMCID: PMC10724341.
 28. Hou J, Chen KX, He C, Li XX, Huang M, Jiang YZ, et al. Aged bone marrow macrophages drive systemic aging and age-related dysfunction via extracellular vesicle-mediated induction of paracrine senescence. *Nat Aging.* 2024; 4 (11): 1562–81. DOI: 10.1038/s43587-024-00694-0. Epub 2024 Sep 12. PMID: 39266768; PMCID: PMC11564114.
 29. de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J. Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development? *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 623175. DOI: 10.3389/fcell.2021.623175. PMID: 33585480; PMCID: PMC7876289.
 30. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res.* 2000; 257 (1): 162–71. DOI: 10.1006/excr.2000.4875. PMID: 10854064.
 31. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5: 99–118. DOI: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144. PMID: 20078217; PMCID: PMC4166495.

References

1. Ajoolabady A, Pratico D, Bahijri S, Tuomilehto J, Uversky VN, Ren J. Hallmarks of cellular senescence: biology, mechanisms, regulations. *Exp Mol Med.* 2025; 57 (7): 1482–91. DOI: 10.1038/s12276-025-01480-7. Epub 2025 Jul 10. PMID: 40634753; PMCID: PMC12322015.
2. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 645593. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593. PMID: 33855023; PMCID: PMC8039141.
3. Hornsby PJ. Senescence as an anticancer mechanism. *J Clin Oncol.* 2007; 25 (14): 1852–7. DOI: 10.1200/JCO.2006.10.3101. PMID: 17488983.
4. Baz-Martínez M, Da Silva-Álvarez S, Rodríguez E, Guerra J, El Motiam A, et al. Cell senescence is an antiviral defense mechanism. *Sci Rep.* 2016; 6: 37007. DOI: 10.1038/srep37007. PMID: 27849057; PMCID: PMC5111111.
5. Prieur A, Besnard E, Babled A, Lemaître JM. p53 and p16(INK4A) independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression. *Nat Commun.* 2011; 2: 473. DOI: 10.1038/ncomms1473. PMID: 21915115.
6. Dasgupta N, Arnold R, Equey A, Gandhi A, Adams PD. The role of the dynamic epigenetic landscape in senescence: orchestrating SASP expression. *NPJ Aging.* 2024; 10 (1): 48. DOI: 10.1038/s41514-024-00172-2. PMID: 39448585; PMCID:

- PMC11502686.
7. Miwa S, Kashyap S, Chini E, von Zglinicki T. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J Clin Invest.* 2022; 132 (13): e158447. DOI: 10.1172/JCI158447. PMID: 35775483; PMCID: PMC9246372.
 8. Kwon Y, Kim JW, Jeoung JA, Kim MS, Kang C. Autophagy Is Pro-Senescence When Seen in Close-Up, but Anti-Senescence in Long-Shot. *Mol Cells.* 2017; 40(9):607–12. DOI: 10.14348/molcells.2017.0151. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28927262; PMCID: PMC5638768.
 9. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- κ B in Aging and Disease. *Aging Dis.* 2011; 2 (6): 449–65. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22396894; PMCID: PMC3295063.
 10. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, et al. Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun.* 2016; 7: 11190. DOI: 10.1038/ncomms11190. PMID: 27048913; PMCID: PMC4823827.
 11. Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochem Med (Zagreb).* 2019; 29 (3): 030501. DOI: 10.11613/BM.2019.030501. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31379458; PMCID: PMC6610675.
 12. Debaqc-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009; 4 (12): 1798–806. DOI: 10.1038/nprot.2009.191. PMID: 20010931.
 13. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92 (20): 9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. PMID: 7568133; PMCID: PMC40985.
 14. Yegorov YE, Akimov SS, Hass R, Zelenin AV, Prudovsky IA. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells. *Exp Cell Res.* 1998; 243 (1): 207–11. DOI: 10.1006/excr.1998.4169. PMID: 9716464.
 15. Doura T, Kamiya M, Obata F, Yamaguchi Y, Hiyama TY, Matsuda T, et al. Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016 Aug 8;55(33):9620–4. DOI: 10.1002/anie.201603328. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27400827.
 16. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* 2018; 14 (10): 576–90. DOI: 10.1038/s41574-018-0059-4. PMID: 30046148.
 17. Liu Z, Liang Q, Ren Y, Guo C, Ge X, Wang L, et al. Immunosenescence: molecular mechanisms and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8 (1): 200. DOI: 10.1038/s41392-023-01451-2. PMID: 37179335; PMCID: PMC10182360.
 18. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev.* 2011; 10 (3): 330–5. DOI: 10.1016/j.arr.2010.08.004. Epub 2010 Aug 20. PMID: 20728581; PMCID: PMC3040253.
 19. Carey A, Nguyen K, Kandikonda P, Kruglov V, Bradley C, Dahlquist KJV, et al. Age-associated accumulation of B cells promotes macrophage inflammation and inhibits lipolysis in adipose tissue during sepsis. *Cell Rep.* 2024; 43 (3): 113967. DOI: 10.1016/j.celrep.2024.113967. Epub 2024 Mar 15. PMID: 38492219; PMCID: PMC11014686.
 20. Mouat IC, Goldberg E, Horwitz MS. Age-associated B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2022; 79 (8): 402. DOI: 10.1007/s00018-022-04433-9. PMID: 35798993; PMCID: PMC9263041.
 21. Zharhary D. Age-related changes in the capability of the bone marrow to generate B cells. *J Immunol.* 1988; 141 (6): 1863–9. PMID: 3262642.
 22. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 (50): 20012–7. DOI: 10.1073/pnas.1116110108. Epub 2011 Nov 28. PMID: 22123971; PMCID: PMC3250139.
 23. Yamamoto R, Nakauchi H. In vivo clonal analysis of aging hematopoietic stem cells. *Mech Ageing Dev.* 2020; 192: 111378. DOI: 10.1016/j.mad.2020.111378. Epub 2020 Oct 3. PMID: 33022333; PMCID: PMC7686268.
 24. Ross JB, Myers LM, Noh JJ, Collins MM, Carmody AB, Messer RJ, et al. Depleting myeloid-biased haematopoietic stem cells rejuvenates aged immunity. *Nature.* 2024; 628 (8006): 162–170. DOI: 10.1038/s41586-024-07238-x. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38538791; PMCID: PMC11870232.
 25. Kovtonyuk LV, Fritsch K, Feng X, Manz MG, Takizawa H. Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Front Immunol.* 2016; 7: 502. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00502. PMID: 27895645; PMCID: PMC5107568.
 26. Blevie A, Motta F, Durante B, Pandolfo C, Selmi C, Sica A. Immunosenescence, Inflammaging, and Frailty: Role of Myeloid Cells in Age-Related Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2023; 64 (2): 123–44. DOI: 10.1007/s12016-021-08909-7. Epub 2022 Jan 15. PMID: 35031957; PMCID: PMC8760106.
 27. Pappert M, Khosla S, Doolittle M. Influences of Aged Bone Marrow Macrophages on Skeletal Health and Senescence. *Curr Osteoporos Rep.* 2023; 21 (6): 771–78. DOI: 10.1007/s11914-023-00820-8. Epub 2023 Sep 9. PMID: 37688671; PMCID: PMC10724341.
 28. Hou J, Chen KX, He C, Li XX, Huang M, Jiang YZ, et al. Aged bone marrow macrophages drive systemic aging and age-related dysfunction via extracellular vesicle-mediated induction of paracrine senescence. *Nat Aging.* 2024; 4 (11): 1562–81. DOI: 10.1038/s43587-024-00694-0. Epub 2024 Sep 12. PMID: 39266768; PMCID: PMC11564114.
 29. de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J. Is Senescence-Associated β -Galactosidase a Reliable in vivo Marker of Cellular Senescence During Embryonic Development? *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 623175. DOI: 10.3389/fcell.2021.623175. PMID: 33585480; PMCID: PMC7876289.
 30. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp Cell Res.* 2000; 257 (1): 162–71. DOI: 10.1006/excr.2000.4875. PMID: 10854064.
 31. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010; 5: 99–118. DOI: 10.1146/annurev-pathol-121808-102144. PMID: 20078217; PMCID: PMC4166495.

ПАНЕЛЬ IFN-I-ИНДУЦИРУЕМЫХ ГЕНОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ СКЛЕРОДЕРМИИ: ПОТЕНЦИАЛ БИОМАРКЕРА СТРАТИФИКАЦИИ

И. А. Шагина^{1,2,5}, М. А. Турчанинова^{2,5}, О. А. Головина³, Л. С. Буфеева^{2,5}, Т. И. Журина³, Р. Ф. Сайфуллин^{1,4}, М. Ю. Мышкин^{2,5}, З. Ю. Мутовина³, О. В. Британова^{2,5}✉

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² ООО «МайЛаборатори», Москва, Россия

³ Московский городской научно-исследовательский центр Больница № 52, Москва, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии, Москва, Россия

⁵ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Системная склеродермия (ССД) остается заболеванием с высокой летальностью; валидированных биомаркеров для стратификации и мониторинга недостаточно. Целью работы было изучить экспрессию разработанной панели IFN-I-индуцируемых генов (*IFI27*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15*, *XAF1*) в периферической крови и пораженной коже при ССД. Исследовали образцы 48 пациентов с ССД и 31 здорового донора. Экспрессию генов определяли методом RT-qPCR ($\Delta\Delta Ct$) с нормировкой по референсному гену «домашнего хозяйства»; экспрессию гена *SFRP4* использовали как маркер кожного фиброза. Экспрессия IFN-I-индуцируемых генов была достоверно ($p < 0,1$) повышена как в крови, так и в коже пациентов с ССД относительно образцов здоровых доноров. Сопоставление экспрессии между компартаментами показало, что уровни экспрессии генов *XAF1*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15* в крови пациентов выше ($p < 0,01$), чем в образцах кожи. Экспрессия гена *IFI27*, напротив, более выражена в коже ($p < 0,01$). Результаты исследования показывают, что разработанная тест-система оценки интерфероновой сигнатуры потенциально может быть использована как неинвазивный инструмент стратификации пациентов с ССД по анализу РНК, полученной из образца крови, в том числе для обоснования назначения терапии блокаторами рецептора IFN-I.

Ключевые слова: системная склеродермия, интерферон I типа, интерфероновая сигнатура, анифролумаб, qRT-PCR, неинвазивная диагностика

Финансирование: исследование выполнено на средства гранта Правительства Москвы (НИР № 1603-47/23 от 08.06.2023), спонсор — АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении».

Вклад авторов: З. Ю. Мутовина — концепция; Т. И. Журина, Р. Ф. Сайфуллин — сбор данных в сфере ревматологии и медицины; анализ литературы М. Ю. Мышкин — анализ данных; Л. С. Буфеева — сбор образцов, выделение РНК; И. А. Шагина — оптимизация и проведение RT-qPCR, первичный анализ данных, подготовка рукописи, анализ литературы; М. А. Турчанинова, О. А. Головина, О. В. Британова — подготовка рукописи, анализ литературы.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации. От всех пациентов получено добровольное информированное согласие в рамках прохождения обследования в стационаре (на взятие образцов биоматериала и проведение анализов).

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Владимировна Британова — ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, 117997, г. Москва, Россия, olbritan@gmail.com; Зинаида Юрьевна Мутовина — ул. Пехотная, д. 3, 123182, г. Москва, Россия, zmutovina@mail.ru

Статья получена: 06.09.2025 **Статья принята к печати:** 08.10.2025 **Опубликована онлайн:** 21.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.047

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/>).

PANEL OF IFN-I-INDUCED GENES IN SYSTEMIC SCLERODERMA: A STRATIFICATION BIOMARKER POTENTIAL

Shagina IA^{1,2,5}, Turchaninova MA^{2,5}, Golovina OA³, Bufeeva LS^{2,5}, Zhurina TI³, Saifullin RF^{1,4}, Myshkin MYu^{2,5}, Mutovina ZYu³, Britanova OV^{2,5}✉

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² MyLaboratory LLC, Moscow, Russia

³ Moscow City Research Center Hospital No. 52, Moscow, Russia

⁴ Federal Scientific and Clinical Center of Resuscitation and Rehabilitation, Moscow, Russia

⁵ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Systemic scleroderma (SS) remains a disease with a high mortality rate; validated biomarkers for stratification and disease monitoring are still lacking. The study aimed to assess the expression of the developed panel of IFN-I-induced genes (*IFI27*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15*, *XAF1*) in peripheral blood and affected skin of patients with SS. We tested samples of 48 SS patients and 31 healthy donors. Gene expression was analyzed using RT-qPCR ($\Delta\Delta Ct$) method (with normalization to the reference housekeeping gene TBP). The *SFRP4* gene expression was used as a marker of skin fibrosis. Expression values of the IFN-I-induced genes were significantly ($p < 0.1$) increased in both blood and skin of SS patients compared to healthy donors. Comparison between compartments revealed that the expression levels of *XAF1*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15* in the patients' blood are higher ($p < 0.01$), than those in skin samples. The *IFI27* gene expression, in contrast, is higher in the skin ($p < 0.01$). The findings show that the test system developed for interferon signature assessment can potentially be used as a noninvasive tool for stratifying SS patients by analysis of RNA from peripheral blood samples, to substantiate the prescription of therapy with the IFN-I receptor blockers.

Keywords: systemic scleroderma, SS, Type I interferon, IFN-I-signature, anifrolumab, qRT-PCR, noninvasive diagnosis

Funding: the study was supported by the grant from the Moscow Government (R&D project No. 1603-47/23 dated 08.06.2023), sponsored by the Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare.

Author contribution: Mutovina ZYu — concept; Zhurina TI, Saifullin RF — acquisition of rheumatology and medicine data; literature review; Myshkin MYu — data analysis; Bufeeva LS — sample collection, RNA extraction; Shagina IA — RT-qPCR optimization and procedure, primary data analysis, manuscript writing, literature review; Turchaninova MA, Golovina OA, Britanova OV — manuscript writing, literature review.

Compliance with ethical standards: the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The informed consent for biomaterial collection and testing during inpatient assessment settings was obtained from all patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga V. Britanova — Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; olbritan@gmail.com; Zinaida Yu. Mutovina — Pekhotnaya, 3, Moscow, 123182, Russia, zmutovina@mail.ru

Received: 06.09.2025 **Accepted:** 08.10.2025 **Published online:** 21.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.047

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/>).

Системная склеродермия (ССД) — системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся васкулопатией, последующим прогрессирующим фиброзом кожи и внутренних органов [1] и высокой смертностью: 25% пациентов погибают в первые 5 лет после постановки диагноза, 37,5% — в первые 10 лет [2–5]. Средняя продолжительность жизни пациентов с ССД на 16–34 года меньше среднестатистической [4]. Распространенность заболевания варьируется от 38 до 341 на миллион человек в год, а частота возникновения новых случаев заболевания колеблется от 8 до 56 человек на миллион в год по данным разных стран [6–11]. Наиболее частой причиной смерти при ССД является поражение внутренних органов — легких, сердца, желудочно-кишечного тракта [4, 5]. Помимо данных проявлений, течение заболевания у 35% пациентов осложнено развитием дигитальных язв, которые в свою очередь часто приводят к гангрене вплоть до ампутации пальцев, что определяет тяжелую функциональную недостаточность у таких пациентов [12–13].

Несмотря на то что заболевание мультисистемно, поражение кожи является его отличительной особенностью и определяет клинико-прогностическую стратификацию. По степени распространенности кожного процесса ССД подразделяют на диффузную форму (дСС) и лимитированную форму (лСС), которые различаются скоростью прогрессирования, особенностями течения и прогнозом [1].

Молекулярные механизмы, которые приводят к развитию ССД, до конца не изучены, что затрудняет подбор таргетной терапии для таких пациентов. В настоящее время выбор потенциальных опций для лечения крайне ограничен, что диктует необходимость поиска новых. Несмотря на то что Т-клеточные ответы типа Th2 и Th17 могут играть важную роль в патогенезе ССД [15, 16], показано, что активация интерфероновых путей, особенно типа I, имеет более выраженную ассоциацию с ССД, чем другие типы иммунного ответа [17, 18].

Последние исследования показывают схожую экспрессию генов, вовлеченных в интерфероновый каскад, у пациентов с системной красной волчанкой и ССД [19–21]. Для ревматоидного артрита, синдрома Шегрена и полимиозита также характерна повышенная экспрессия IFN-ассоциированных генов [23–29].

Активация пути IFN-I и соответственно «интерфероновая» генная сигнатура наблюдаются у значительной части пациентов с ССД уже на ранних стадиях в крови и коже и, по некоторым данным, ассоциируются с тяжестью поражения (в том числе легких и кожи) [30, 31]. Вывод о зависимости между уровнями экспрессии IFN-индуцированных генов с тяжестью заболевания, опровергается исследованиями [28, 32].

Актуальные рекомендации EULAR (обновление 2023) отражают смещение к таргетным подходам при ССД, что повышает значение валидируемых биомаркеров стратификации [33]. Эти наблюдения поднимают вопрос о потенциальной эффективности блокирования интерферон-опосредованных путей у части больных ССД.

Цель данной работы — провести оценку уровня экспрессии интерферон-зависимых генов у пациентов с ССД в клетках периферической крови и в поврежденных участках кожи для оценки потенциальной возможности стратификации пациентов и прогноза перспективной, но не одобренной в настоящее время терапии антителами к рецепторам интерферона при ССД [34]. Тестировали гипотезу, что IFN-I-сигнатура у пациентов с ССД может

отражаться в периферической крови, анализ которой может стать альтернативой повторным биопсиям кожи для стратификации и мониторинга пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование были включены пациенты в возрасте 21–77 лет с системной склеродермией с лимитированной или диффузной формой заболевания, поступившие в ревматологическое отделение ГБУЗ МКНИЦ Больница 52 ДЗМ с апреля 2023 по февраль 2025 г., соответствующие критериям ACR/EULAR2013 [35].

Критерии включения: наличие антинуклеарного фактора в крови пациентов, определенное методом непрямой иммунофлюоресценции. При обнаружении антинуклеарного фактора, проводилось исследование спектра ядерных антител методом иммуноблотинга (табл. 1).

Критерии исключения: наличие иных системных аутоиммунных заболеваний (например, ревматоидного артрита, идиопатических воспалительных миопатий, системной красной волчанки); наличие признаков инфекционных заболеваний (по внешним признакам).

Из исследования не исключали пациентов при отсутствии каких-либо конкретных антител или отрицательном результате иммуноблота, так как:

1) для постановки диагноза ССД, согласно критериям ACR/EULAR, наличие конкретных антител не является обязательным критерием для постановки диагноза [35];

2) для ССД также характерны антитела к РНК-полимеразе III, которые не определяют в РФ; кроме того, ССД может быть ассоциирована с антителами вне анализируемого спектра.

Скрининговое определение антинуклеарных антител проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) на полуавтоматическом ИФА-анализаторе Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific Inc., США) при помощи набора реагентов ANA-Screen ELISA IgG (Euroimmun AG, Германия) согласно инструкции производителя. Подтверждающее определение антинуклеарных антител проводили методом иммуноблота при помощи набора реагентов ANA profile 1 IgG (Euroimmun AG, Германия) согласно инструкции производителя.

Проведены клинико-иммунологическая оценка пациентов, включая оценку активности заболевания согласно EScSG (табл. 1) [36], оценка капилляроскопического паттерна на момент осмотра, лабораторная оценка на наличие специфических антител. Все пациенты были обследованы на наличие/отсутствие поражения возможных органов мишеней: кожи (проведен кожный счет по Rodnan), суставов (оценено число болезненных и припухших суставов), легких (всем пациентам была выполнена мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) органов грудной клетки (ОГК)), сердца и легочной артерии (проведены электрокардиография, ЭХО-кардиография, катетеризация желудочно-кишечного тракта у одного пациента (проведена рентгеноскопия пищевода с барием)).

Отбор и обработка биологического материала, выделение РНК

Сбор образцов осуществляли в клинике в рамках общего обследования пациентов при поступлении в больницу. Всего в исследование было включено 48 пациентов

с ССД. У 25 пациентов в качестве биологического материала для исследования были взяты только образцы периферической крови. Еще для 10 пациентов были также получены препараты пораженного участка кожи и образцы периферической крови, а для 13 пациентов были взяты только образцы пораженного участка кожи. Образцы биопсии кожи брали из предплечья, из места наибольшего уплотнения кожи, методом инцизионной биопсии.

В качестве образцов сравнения использовали образцы здоровой кожи трех доноров без диагноза ССД, а также образцы периферической венозной крови 31 здорового донора в возрасте 20–54 лет. 20% когорты здоровых доноров составляли мужчины.

Образцы пораженной кожи пациентов диаметром 4 мм помещали в протективный раствор для тканей (MACS® Tissue Storage Solution, Miltenyi, США) на +4 °С и передавали в лабораторию для выделения РНК. Полученные образцы измельчали в жидком азоте с одновременным добавлением лизирующего буфера RLT. Выделение РНК проводили с помощью набора реагентов HiPure Total RNA Kit (Magen, Китай) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 3.0 и набора реагентов (Thermo Fisher Scientific, США).

Образцы крови (4 мл) забирали в пробирки с добавленной в качестве антикоагулянта калиевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2 мг/мл. Цельную кровь после забора и до выделения мононуклеаров хранили при 4 °С. Выделение мононуклеаров периферической крови проводили методом седиментации в растворе фиколла плотностью 1,077 («ПанЭко», РФ). Полученную фракцию клеток помещали в лизирующий буфер RLT (Qiagen, Германия) и в таком виде хранили при температуре –80 °С до момента выделения тотальной РНК. Выделение тотальной РНК проводили с помощью набора HiPure Total RNA Kit (Magen, Китай) согласно инструкции производителя.

Концентрацию РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 3.0 (США) и набора реагентов (Thermo Fisher Scientific, США). Качество выделенного препарата РНК оценивали с помощью метода гель-электрофореза в агарозном геле. Выделенную РНК замораживали и хранили при температуре –80 °С до момента постановки обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени.

Постановка ОТ-ПЦР и анализ данных

Количественную ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) в одной пробирке проводили с использованием набора реагентов One-Tube RT-PCR TaqMan («Евроген», Россия) [37]. Набор представляет собой мастер-микс, содержащий реакционный буфер для ОТ и ПЦР, нуклеотидтрифосфаты и Taq ДНК-полимеразу с «горячим стартом». На первом этапе, когда происходит синтез первой цепи кДНК, Taq-полимеразу инактивировали моноклональными антителами; прогрев при 95 °С перед ПЦР обеспечивает быстрый «горячий старт». Модифицированную MMLV-ревертазу добавляли в реакционную смесь отдельно. Праймеры, служащие одновременно затравкой для синтеза первой цепи кДНК и для последующей ПЦР-амплификации, добавляли в реакцию в концентрации 0,4 мкМ. Визуализацию накопления продуктов ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием флуоресцентных проб типа TaqMan. Пробы добавляли в реакцию в концентрации 0,1 мкМ. Все олигонуклеотиды,

специфичные к исследуемым и референсным генам, подбирали таким образом, чтобы оптимум их работы обеспечивался применением одного универсального ОТ-ПЦР протокола.

Обратная транскрипция: 55 °С, 15 мин, один цикл, без считывания флуоресценции. Затем проводили инактивацию ревертазы/активацию полимеразы: 95 °С, 1 мин, один цикл, без считывания. Далее 40 циклов амплификации: денатурация — 95 °С, 15 с (без считывания); отжиг — 60 °С, 20 с (со считыванием флуоресценции); элонгация — 72 °С, 20 с (без считывания).

Для анализа интерфероновой сигнатуры оценивали уровень экспрессии *IFIT1*, *IFIT3*, *IFI27*, *IFI44*, *ISG15*, *XAF1*, ранее протестированной на образцах периферической крови пациентов с системной красной волчанкой (СКВ) и референсного гена TBP [29, 31].

Для анализа интерфероновой сигнатуры оценивали уровень экспрессии *IFIT1*, *IFIT3*, *IFI27*, *IFI44*, *ISG15*, *XAF1* и референсного гена TBP. По той же методике оценивали экспрессию гена-маркера *SFRP4*, признанного в качестве маркера, ассоциированного с прогрессированием фиброза при склеродермии [22].

Относительный уровень экспрессии интерферон-зависимых генов оценивали с использованием нормирования на экспрессию гена «домашнего хозяйства» TBP.

Относительную экспрессию определяли методом $\Delta\Delta Ct$ с нормированием по референсному гену, амплифицируемому в той же ПЦР. Относительный уровень экспрессии исследуемого гена определяли исходя из эффективности его амплификации и разности пороговых циклов (Ct) исследуемого гена по сравнению с референсным.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки результатов использовали непараметрические методы, пригодные для малых выборок данных.

Для сравнения уровня экспрессии генов между образцами доноров из экспериментальной (пациенты с ССД) и контрольной групп использовали тест Манна-Уитни. Для сравнения значений экспрессии генов в образцах кожи и крови статистическую значимость разницы выборок оценивали с использованием парного критерия Уилкоксона. Все значения p -value были дополнительно скорректированы с помощью поправки на множественное сравнение Бенджамини-Хохберга. Для оценки корреляции между показателями использовали коэффициент корреляции Спирмена.

Значение IFN-I-сигнатуры считали как среднее из стандартизированных оценок (z -score) относительного уровня экспрессии пяти генов (*IFIT3*, *IFI27*, *IFI44*, *ISG15*, *XAF1*). Стандартизированные оценки корреляции усредненной IFN-I-сигнатуры между кровью и кожей вычисляли относительно распределения значений внутри группы пациентов, для которых были получены парные образцы крови и кожи.

Стандартизированные оценки значений IFN-I-сигнатуры в образцах периферической крови вычисляли относительно распределения значений в группе здоровых доноров — отдельно для образцов крови и кожи.

Рассчитывали средние значения и стандартное отклонение (табл. 2 и 3). Однако в связи с ограниченной применимостью данных показателей для малых выборок (с недоказанной гипотезой о нормальном распределении значений) приведены также расчеты медианы и межквартильного расстояния.

Таблица 1. Результаты клинико-иммунологического обследования пациентов с ССД (n = 48)

Показатель	Значения	Стандартное отклонение
Средний возраст	61 (от 21 до 77)	61,4
Пол	Мужчины 5/48 (10%), женщины 43/48 (90%)	0,31
Длительность заболевания	13,5 лет (от 0,5 до 47)	13,6
Течение	острое — 3/48 (6%) подострое — 5/48 (10%) хроническое — 40/48 (84%)	0,24 0,31 0,37
Форма	Лимитированная — 30/48 (62,5%), диффузная — 18/48 (37,5%)	0,48
Органые поражения		
Интерстициальное поражение легких	27/48 (56%)	0,5
– КТ-паттерн организующей пневмонии	2/48 (4%)	0,2
– КТ-паттерн неспецифической интерстициальной пневмонии	25/48 (52%)	0,5
Первичная легочная гипертензия	12/48 (25%)	0,43
Поражение почек	2/48 (4%)	0,2
Поражение сердца	14/48 (29%)	0,45
– Перикардит	12/48 (25%)	0,42
– Миокардит	3/48 (6%)	0,24
Поражение пищевода	34/48 (71%)	0,45
Поражение кишечника	6/48 (12,5%)	0,33
Поражение мышц	9/48 (19%)	0,39
Поражение суставов	28/48 (58%)	0,49
Кожные проявления	46/48 (96%)	0,2
– дигитальные язвы	15/48 (31%)	0,46
Признаки синдрома Рейно	47/48 (98%)	0,14
Капилляроскопический паттерн	поздний — 27/48 (56%), активный — 16/48 (33%), ранний — 3/48 (6%), миопатический — 2/48 (4%)	0,50 0,47 0,24 0,20
Телеангиэктазии	27/48 (56%)	0,49
Счет по Rodnan, баллы	7 (0–37)	6,9
Лабораторные анализы		
Антитела к центромерам (ACA)	25/48 (52%)	0,5
Антитела к Scl70	14/48 (29%)	0,45
АнтиPm-Scl	1/48 (2%)	0,14
Антитела к RNP 70	1/48 (2%)	0,14
Анти SSA	1/48 (2%),	0,14
Без специфических антител	6/48 (12,5%)	0,33
Терапия (на момент взятия образцов)		
Микофенолата мофетил (ММФ) — 14/48 (29%), глюкокортикоиды (ГК) в низкой дозе — 25/48 (52%), гидроксихлорохин (ГХ) — 13/48 (27%), ритуксимаб (РТХ) — 11/48 (23%), нинтеданиб — 3/48 (6%), циклофосфан (ЦФ) — 1/48 (2%), метотрексат (МТ) — 2/48 (4%), без терапии — 8/48 (16,7%)		
Низкоиммуносупрессивная терапия (ГХ и/или низкие дозы ГК)	18/48 (37,5%)	0,48
Высокоиммуносупрессивная терапия (ММФ и/или РТХ и/или МТ)	22/48 (46%)	0,50

Стандартное отклонение для бинарных клинических признаков рассчитывали для распределения Бернулли.

Всю работу с таблицами, корректировку данных, построение графиков и применение статистических тестов проводили с помощью встроенных функций языка R и дополнительных библиотек к нему: tidyverse, ggplot2 и corrplot.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены 48 пациентов с ССД, преимущественно женщины (90%), средний возраст 61 год,

длительность болезни 13,5 лет, в основном с хроническим течением (84%) и лимитированной формой болезни (62,5%). Ведущее органное поражение — интерстициальное заболевание легких (56%, главным образом NSIP); часто встречалось поражение пищевода (71%) и суставов (58%). Кожная активность в среднем низкая (mRSS 7), феномен Рейно диагностирован почти у всех (98%), дигитальные язвы — у 31%. Результаты клинико-иммунологического обследования пациентов с ССД представлены в табл. 1.

Для интегральной оценки IFN-I-сигнатуры использовали модификацию тест-системы из пяти генов: *IFI27*, *XAF1*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15*, с использованием одного референсного

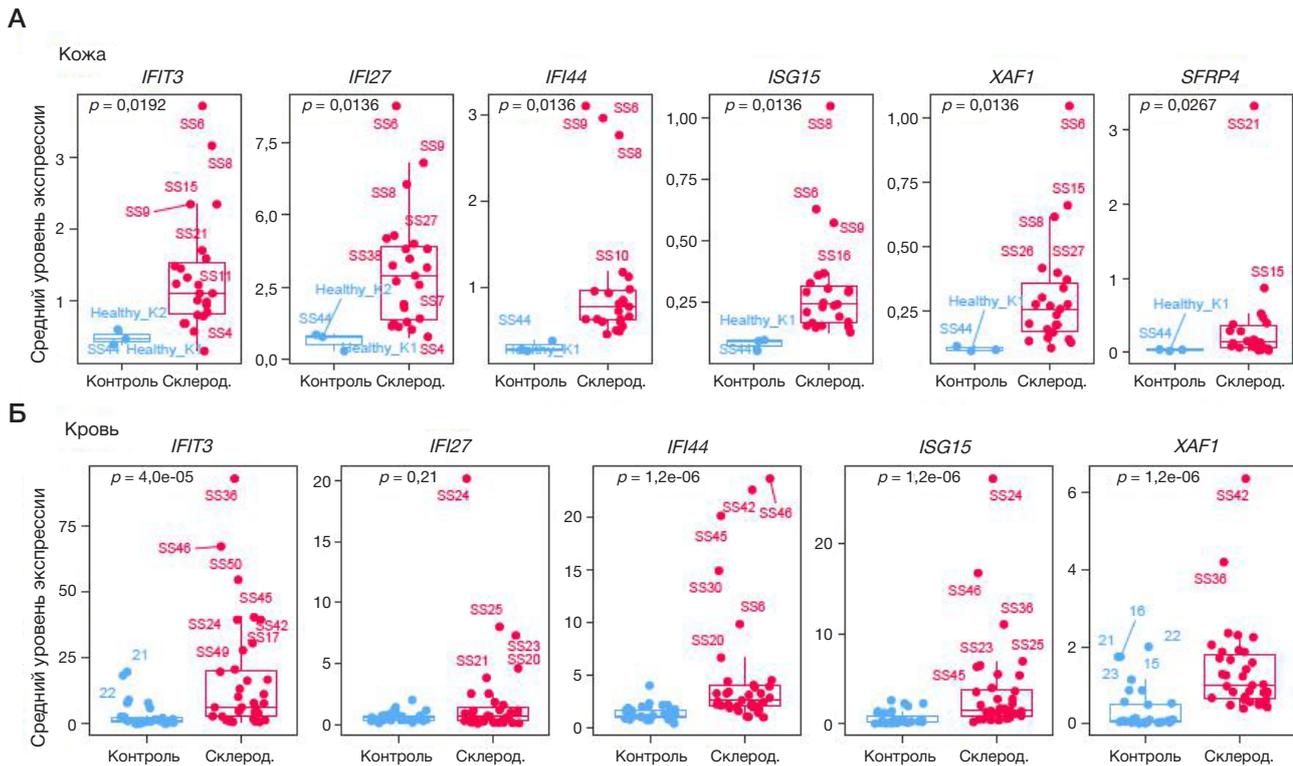


Рис. 1. Сравнение относительных уровней экспрессии исследуемых генов методом ОТ-ПЦР в реальном времени (*p*-value — по критерию Манна–Уитни) между образцами кожи в группах больных ССД (*n* = 23) и здоровых доноров (*n* = 3) (А), между образцами периферической крови в группах больных ССД (*n* = 35) и здоровых доноров (*n* = 31) (Б). Склерод. — склеродерма

гена вместо двух, ранее протестированной на образцах периферической крови пациентов с СКВ [32, 38]. В качестве гена-маркера заболевания использовали SFRP4 (от англ. secreted frizzled-related protein), уровень экспрессии которого ассоциирован с кожным фиброзом при ССД [22].

Уровень экспрессии для всех пяти анализируемых генов достоверно отличался между группами больных ССД и здоровых доноров для образцов РНК, выделенных из кожи, и для 4 из 5 анализируемых генов (за исключением *IFI27*), между группами больных ССД и здоровых доноров для образцов крови (рис. 1А, Б; табл. 2.). Уровень экспрессии SFRP4 был повышен в образцах кожи пациентов с ССД по сравнению с образцами кожи здоровых доноров (рис. 1А).

Сопоставление экспрессии между компартментами, проведенное на парных образцах кровь/кожа (рис. 2; табл. 3), показало, что уровни экспрессии генов *XAF1*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15* в крови пациентов значительно выше, чем в образцах кожи. Экспрессия гена *IFI27*, напротив, более выражена в коже (рис. 2А, В). Направленность изменений сохранялась в обоих типах материала, что поддерживает эффективность применения как кожных биопсий, так и образцов крови для диагностики и динамического мониторинга (рис. 2Б, Г). Интегральный индекс IFN-I-сигнатуры у пациентов с ССД значительно превышает референсный пороговый интервал, рассчитанный по значениям здоровых доноров, как в образцах периферической крови, так и в биоптатах пораженной кожи (рис. 2Д, Е). Ограничение способа сравнения индекса IFN-I-сигнатуры в коже связано с

Таблица 2. Уровень экспрессии генов в образцах кожи в группах больных ССД (*n* = 23) и здоровых доноров (*n* = 3) (А), в образцах периферической крови в группах больных ССД (*n* = 35) и здоровых доноров (*n* = 31) (Б)

ген	группа	А. Образцы кожи				Б. Образцы крови			
		ср.знач	ст.откл.	медиана	iqr*	ср.знач	ст.откл.	медиана	iqr*
<i>IFIT3</i>	Контроль	0,47	0,11	0,46	0,1	3,15	4,87	1,15	1,76
<i>IFIT3</i>	ССД	1,36	0,84	1,1	0,72	16,37	21,17	6,35	17,24
<i>IFI27</i>	Контроль	0,64	0,31	0,78	0,28	0,59	0,39	0,54	0,35
<i>IFI27</i>	ССД	3,11	2,02	2,89	2,56	1,91	3,69	0,72	1,07
<i>IFI44</i>	Контроль	0,31	0,06	0,28	0,06	1,38	0,69	1,15	0,68
<i>IFI44</i>	ССД	1,03	0,78	0,78	0,35	4,9	5,98	2,58	1,93
<i>ISG15</i>	Контроль	0,08	0,02	0,09	0,02	0,65	0,76	0,31	0,71
<i>ISG15</i>	ССД	0,3	0,21	0,24	0,15	3,63	5,33	1,48	2,94
<i>XAF1</i>	Контроль	0,1	0,01	0,1	0,01	0,37	0,57	0,08	0,47
<i>XAF1</i>	ССД	0,31	0,22	0,26	0,18	1,39	1,17	1	1,13
<i>SFRP4</i>	Контроль	0,03	0,01	0,04	0,01	нд	нд	нд	нд
<i>SFRP4</i>	ССД	0,36	0,69	0,14	0,28	нд	нд	нд	нд

Примечание: * iqr — межквартильное расстояние.

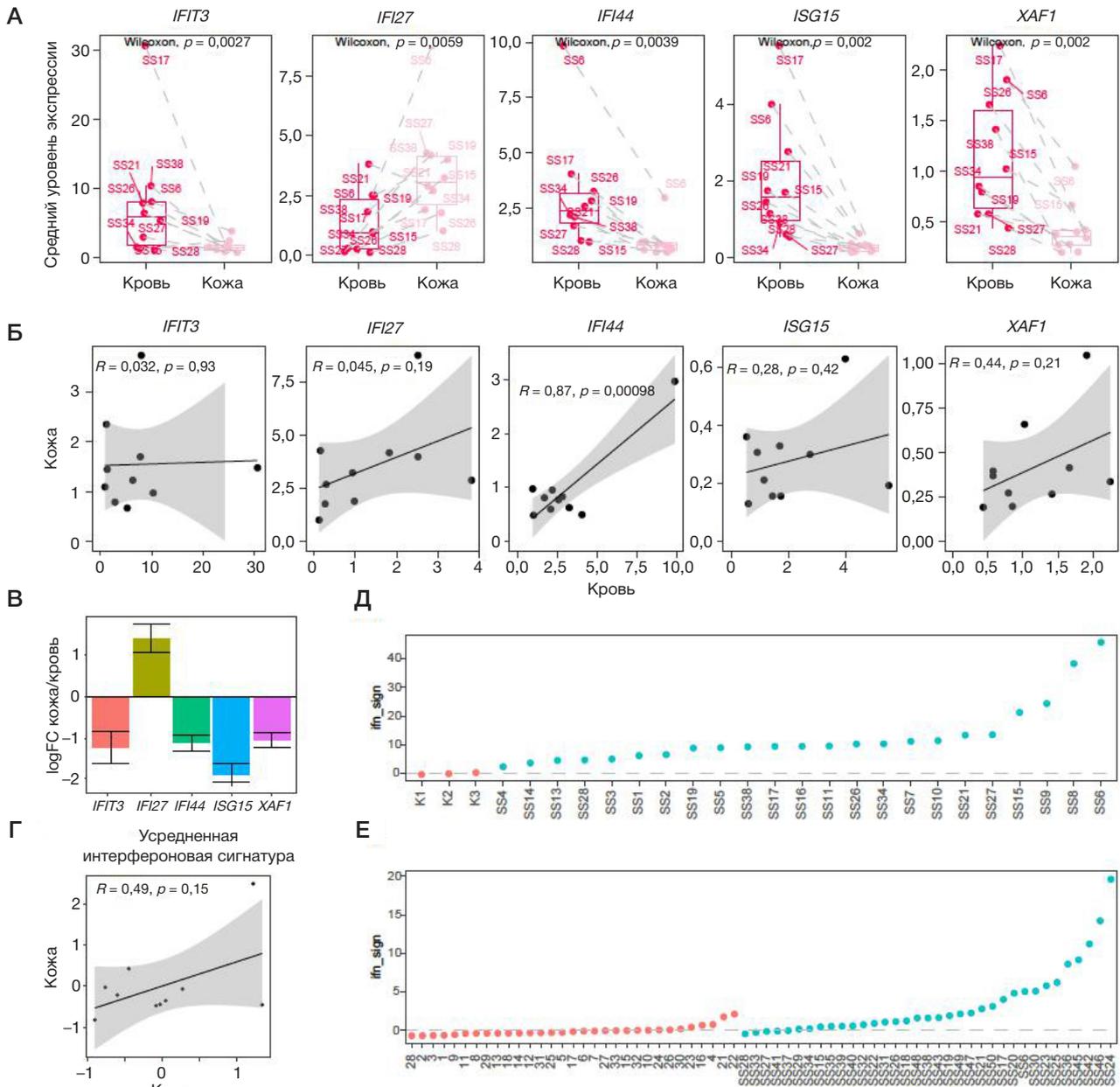


Рис. 2. Сравнение интерфероновой сигнатуры в крови и коже пациентов с ССД. **А.** Сравнение относительных уровней экспрессии исследуемых генов *IFIT3*, *IFI27*, *IFI44*, *ISG15*, *XAF1* в образцах РНК кожи и периферической крови пациентов с ССД ($n = 10$), представленных в виде боксплота. Применен парный критерий Уилкоксона. **Б.** Парная корреляция экспрессии генов панели IFN-I между кровью и кожей. **В.** В виде столбчатой диаграммы показаны средние значения логарифмов относительной экспрессии генов (log-fold-change) в коже к экспрессии генов в крови. Отрицательные значения указывают на большую экспрессию в крови, положительные — в коже. **Г.** Корреляция усредненной IFN-I-сигнатуры между кровью и кожей парных образцов ($n = 10$), ($R = 0,49$; $p = 0,15$). **Д, Е.** Использован коэффициент корреляции Спирмена (серые области — 95% ДИ). **Д.** Значения IFN-I-сигнатуры (z-score, нормировка по донорам) в образцах кожных биопсий: красные точки — здоровые доноры ($n = 3$), синие точки — пациенты с ССД ($n = 23$). **Е.** Значения IFN-I-сигнатуры (z-score, нормировка по здоровым донорам) в образцах периферической крови. Красные точки — здоровые доноры ($n = 31$), синие точки — пациенты с ССД ($n = 35$, включая 10 парных образцов кожа/кровь). Пунктирной линией отмечен пороговый интервал

малым числом образцов здоровых доноров. Интегральный индекс, посчитанный по крови, показал, что у 62% (22 пациента) превышен референсный интервал.

Корреляционный анализ клинических параметров и экспрессии генов (рис. 3; табл. 4) показал, что гены IFN-I-сигнатуры (*IFIT3*, *IFI27*, *IFI44*, *ISG15*, *XAF1*) образуют тесно согласованный модуль (R_s — от 0,52 до 0,87; $p < 0,05$ для кожи) с выраженными положительными межгенными корреляциями, тогда как *SFRP4* практически не связан с этим модулем и отражает отдельный, фиброз-ассоциированный компонент.

В образцах крови гены *IFIT3*, *IFI27*, *ISG15*, *XAF1* также образуют корреляционный кластер друг с другом, но с

несколько меньшими значениями корреляции (R_s — от 0,38 до 0,63). Ген *IFI27* образует самую тесную связь с *ISG15* ($R_s = 0,77$), однако выпадает из общего кластера корреляций (R_s с *IFIT3*, *IFI27*, *ISG15*, *XAF1* $< 0,15$).

Клинические признаки «тяжести» заболевания (активность по EScSG, прогрессия, диффузная форма) заметно коррелируют между собой.

Гены IFN-I-сигнатуры показывают незначительную корреляцию с диффузной формой заболевания: в образцах кожи R_s составляет от 0,23 до 0,34, в образцах кожи небольшая корреляция наблюдается только для *ISG15* и *IFI27* (0,21 и 0,27 соответственно). Возраст слабоотрицательно ассоциирован с уровнем экспрессии

Таблица 3. Уровень экспрессии исследуемых генов *IFIT3*, *IFI27*, *IFI44*, *ISG15*, *XAF1* в образцах РНК кожи и периферической крови этих же пациентов с ССД ($n = 10$)

Ген	Выборка	Среднее значение	Стандартное отклонение	Медиана	Iqr*
<i>IFIT3</i>	кровь	7,48	8,73	5,81	6,17
<i>IFIT3</i>	кожа	1,55	0,91	1,34	0,64
<i>IFI27</i>	кровь	1,34	1,27	0,96	2,07
<i>IFI27</i>	кожа	3,48	2,16	3,07	2,03
<i>IFI44</i>	кровь	3,05	2,57	2,39	1,34
<i>IFI44</i>	кожа	0,95	0,73	0,79	0,32
<i>ISG15</i>	кровь	2,04	1,62	1,57	1,54
<i>ISG15</i>	кожа	0,28	0,15	0,26	0,16
<i>XAF1</i>	кровь	1,15	0,62	0,94	0,97
<i>XAF1</i>	кожа	0,42	0,26	0,35	0,14

Примечание: * — межквартильное расстояние.

IFN-I-индуцированных генов (R_s — от $-0,32$ до $-0,36$) в образцах кожи, для крови связи незначительны (от 0 до $-0,13$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Определение уровня экспрессии IFN-I-стимулированных генов с помощью метода ПЦР в последнее время все чаще применяют в клинических исследованиях. Разработаны различные диагностические тест-системы для анализа экспрессии IFN-сигнатуры. Наиболее часто в рамках определения IFN-сигнатуры выявляют уровень экспрессии генов *IFI44L*, *IFI44*, *MX1*, *MX2*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *SIGLEC1*, *IFI35* [39]. Российскими учеными также предложены решения в этом направлении [40, 41]. В частности, одна из систем включает анализ трех генов (*RIG-1*, *IFIT-1*, *IFIH-1*). Однако подход к нормализации экспрессии в этих панелях представляется неоптимальным: в первой в качестве референсного гена используют HPRT, но не описывают нормировку по ΔCt , а во второй в качестве референсного гена предлагается использовать GAPDH, что может

приводить к артефактам из-за наличия многочисленных псевдогенов в геноме человека. В данной работе мы использовали интегральную оценку IFN-I-сигнатуры с помощью тест-системы из пяти генов: *IFI27*, *XAF1*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15* с нормированием на один референсный ген. Ранее эти гены по отдельности и в виде тест-системы были протестированы нами на образцах периферической крови пациентов с СКВ [32, 38].

Согласно проведенному исследованию, у пациентов с ССД, по сравнению со здоровыми донорами, отмечено повышение экспрессии интерферон-индуцированных генов как в образцах кожи, так и в образцах периферической крови. Эти данные подтверждают вовлеченность интерферонов I типа в патогенез заболевания и согласуются с ранее опубликованными результатами по ССД [17, 21, 30]. По результатам нашего анализа уровень экспрессии IFN-I-индуцированных генов имеет тенденцию к корреляции в образцах крови и пораженных участках кожи. Подобная закономерность ранее была продемонстрирована на большей когорте пациентов с ССД с использованием транскриптомного профилирования (microarray). Было

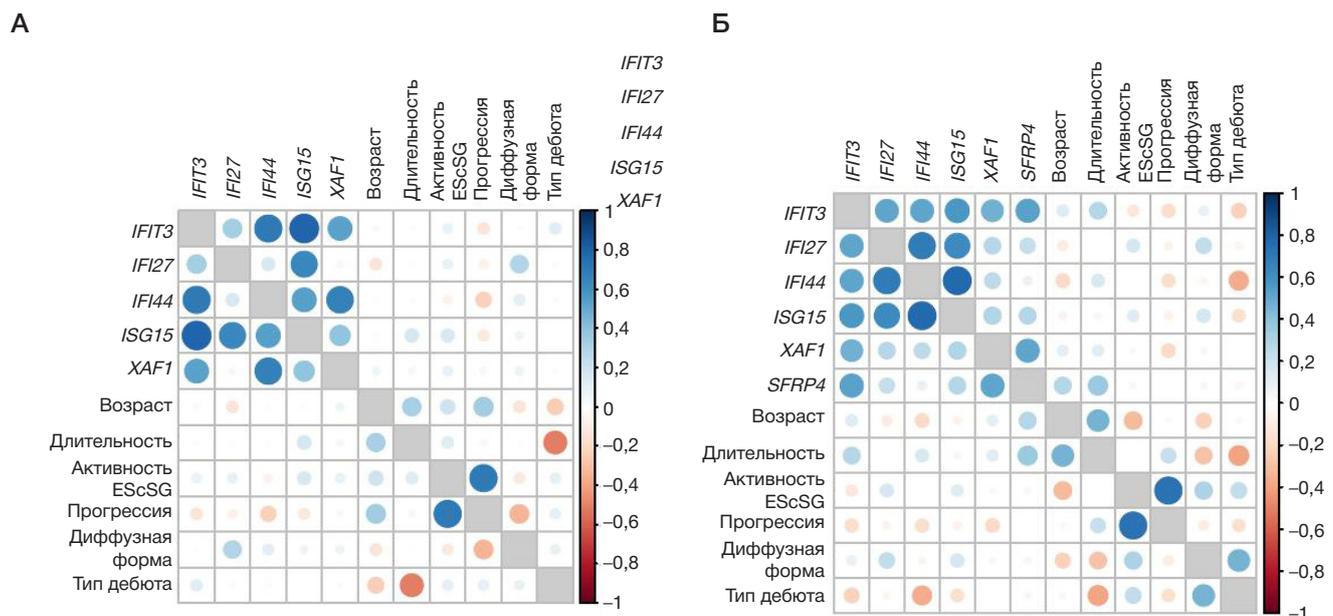


Рис. 3. Матрица корреляции уровня экспрессии генов IFN-I-сигнатуры (*IFI44*, *IFIT3*, *ISG15*, *IFI27*, *XAF1*) в образцах и клинических признаков в группе пациентов с ССД для образцов периферической крови ($n = 35$) (А) и для образцов пораженной кожи ($n = 23$) (Б). Экспрессия гена *SFRP4* добавлена, как маркер заболевания. Цвет круга показывает знак и силу корреляции: синий — положительная, красный — отрицательная; чем насыщеннее цвет, тем ближе $|r|$ к 1. Размер круга пропорционален модулю коэффициента корреляции Спирмена

Таблица 4. Значения корреляции между уровнем экспрессии генов IFN-I-сигнатуры (*IFI44*, *IFIT3*, *ISG15*, *IFI27*, *XAF1*) в образцах и клиническими признаками в группе пациентов с ССД в образцах крови ($n = 35$), (4А) и в образцах кожи ($n = 23$) (4Б)

4А	<i>IFIT3</i>	<i>IFI27</i>	<i>IFI44</i>	<i>ISG15</i>	<i>XAF1</i>	Возраст	Длительность	Активность (E _{ScSG})	Прогрессия	Диффузная форма	Тип дебюта
<i>IFIT3</i>	1,00	0,16	0,49	0,63	0,63	0,03	0,01	0,24	0,06	0,08	0,11
<i>IFI27</i>	0,16	1,00	-0,04	0,77	-0,17	-0,03	0,10	0,06	0,03	0,27	-0,09
<i>IFI44</i>	0,49	-0,04	1,00	0,38	0,64	-0,13	-0,22	-0,08	-0,08	-0,13	0,24
<i>ISG15</i>	0,63	0,77	0,38	1,00	0,24	0,00	0,00	0,16	0,08	0,21	0,06
<i>XAF1</i>	0,63	-0,17	0,64	0,24	1,00	-0,08	0,04	0,06	-0,13	0,04	0,00
Возраст	0,03	-0,03	-0,13	0,00	-0,08	1,00	0,31	0,18	0,32	-0,12	-0,16
Длительность	0,01	0,10	-0,22	0,00	0,04	0,31	1,00	0,15	0,07	-0,14	-0,36
Активность (E _{ScSG})	0,24	0,06	-0,08	0,16	0,06	0,18	0,15	1,00	0,60	-0,02	0,20
Прогрессия	0,06	0,03	-0,08	0,08	-0,13	0,32	0,07	0,60	1,00	-0,34	0,12
Диффузная форма	0,08	0,27	-0,13	0,21	0,04	-0,12	-0,14	-0,02	-0,34	1,00	0,15
Тип дебюта	0,11	-0,09	0,24	0,06	0,00	-0,16	-0,36	0,20	0,12	0,15	1,00

4Б	<i>IFIT3</i>	<i>IFI27</i>	<i>IFI44</i>	<i>ISG15</i>	<i>XAF1</i>	<i>SFRP4</i>	Возраст	Длительность	Активность (E _{ScSG})	Прогрессия	Диффузная форма	Тип дебюта
<i>IFIT3</i>	1,00	0,79	0,82	0,80	0,79	0,22	-0,36	0,13	0,01	-0,15	0,23	-0,19
<i>IFI27</i>	0,79	1,00	0,87	0,74	0,59	0,03	-0,36	-0,09	0,15	-0,09	0,34	-0,08
<i>IFI44</i>	0,82	0,87	1,00	0,87	0,52	-0,05	-0,51	-0,07	0,13	-0,09	0,28	-0,24
<i>ISG15</i>	0,8	0,74	0,87	1,00	0,54	0,05	-0,57	-0,04	0,21	0,02	0,31	-0,20
<i>XAF1</i>	0,79	0,59	0,52	0,54	1,00	0,22	-0,32	0,16	0,02	-0,19	0,16	-0,12
<i>SFRP4</i>	0,22	0,03	-0,05	0,05	0,22	1,00	0,37	0,22	-0,07	0,13	0,17	-0,15
Возраст	-0,36	-0,36	-0,51	-0,57	-0,32	0,37	1,00	0,34	-0,25	-0,02	-0,19	0,05
Длительность	0,13	-0,09	-0,07	-0,04	0,16	0,22	0,34	1,00	-0,01	0,16	-0,39	-0,34
Активность (E _{ScSG})	0,01	0,15	0,13	0,21	0,02	-0,07	-0,25	-0,01	1,00	0,7	0,32	0,35
Прогрессия	-0,15	-0,09	-0,09	0,02	-0,19	0,13	-0,02	0,16	0,7	1,00	-0,1	-0,11
Диффузная форма	0,23	0,34	0,28	0,31	0,16	0,17	-0,19	-0,39	0,32	-0,1	1,00	0,45

показано, что экспрессия IFN-ассоциированных генов в коже согласуется с аналогичными изменениями в периферической крови [42]. Эти и другие наблюдения указывают на информативность оценки IFN-I-сигнатуры в образцах крови пациентов с ССД [18].

Клинические признаки тяжести заболевания (активность по E_{ScSG}, прогрессия, диффузная форма) заметно коррелируют между собой, но демонстрируют лишь слабые и неоднородные связи с IFN-I-сигнатурой. Таким образом, применимость разработанной тест-системы для стратификации пациентов и прогноза успешности терапии ингибиторами рецептора IFN-I следует оценивать независимо от тяжести и формы заболевания.

В связи с тем что уровень оцениваемой IFN-I-сигнатуры у некоторых пациентов с ССД находится в зоне значений, близких к контролю (рис. 2), и не выявлена корреляция между экспрессией генов и тяжестью заболевания (рис. 3), можно предположить у пациентов с ССД наличие различных иммунологических паттернов, кроме паттерна активации интерферона I типа (по аналогии с описанными в [26] паттернами при СКВ). Наличие у пациентов с ССД как значимо более высоких, так и низких (на уровнях контрольной группы) уровней экспрессии IFN-индуцированных генов может свидетельствовать о необходимости стратификации пациентов для прогноза эффекта от терапии антителами к рецептору интерферона.

С учетом текущих клинических исследований ингибитора рецептора IFN-I при ССД (DAISY; NCT05631227) [37]

повышенное значение IFN-I-сигнатуры потенциально может служить критерием отбора пациентов и инструментом мониторинга эффективности ответа на терапию блокатором рецепторов интерферона (анифролумаб). Схожесть сигнальных путей для ССД и СКВ, связанных с интерфероном [14, 23, 42], а также имеющиеся данные об эффективности анифролумаба при СКВ [43], позволяют предположить, что использование данного препарата при ССД тоже может быть высокоэффективным для пациентов, имеющих высокие значения интерфероновой сигнатуры.

ВЫВОДЫ

У пациентов с ССД, по сравнению со здоровыми донорами, отмечено повышение экспрессии интерферон-индуцированных генов как в образцах кожи, так и в образцах периферической крови, что указывает на вовлеченность интерферонов I типа в патогенез ССД. Уровень экспрессии IFN-I-индуцированных генов имеет тенденцию к корреляции в образцах крови и пораженных участках кожи. Разработанная RT-qPCR-панель, включающая IFN-I-индуцируемые гены (*IFI27*, *IFI44*, *IFIT3*, *ISG15*, *XAF1*), обладает потенциалом для стратификации пациентов с ССД, а также для оценки эффективности таргетной терапии блокаторами рецепторов интерферона (в случае одобрения данной терапии для ССД). Для проверки данного вывода требуется проведение дополнительного

исследования корреляции между снижением уровня интерфероновой подпери и улучшения состояния пациентов с ССД при терапии антителами к рецептору интерферона. Для анализа интерфероновой сигнатуры методом RT-PCR с использованием предложенных генов

можно рекомендовать использование периферической крови пациентов с ССД, так как данный биоматериал более доступен, менее инвазивен и более воспроизводим при потенциально сопоставимой информативности с образцами кожи.

Литература

- Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51 (6): 1017–26. DOI: 10.1093/rheumatology/ker269. PMID: 21900368.
- Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum*. 2014; 44 (2): 208–19. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2014.05.010.
- Nikpour M, Baron M. Mortality in systemic sclerosis: lessons learned from population-based and observational cohort studies. *Curr Opin Rheumatol*. 2014; 26 (2): 131–7. DOI: 10.1097/BOR.000000000000027.
- Elhai M, Meune C, Boubaya M, et al. EUSTAR group. Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76 (11): 1897–905. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-211448.
- Rosa JE, Soriano ER, Narvaez-Ponce L, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in a healthcare plan in Buenos Aires. *J Clin Rheumatol*. 2011; 17 (2): 59–63. DOI: 10.1097/RHU.0b013e31820e7e8d.
- Furst DE, Fernandes AW, Iorga SR, Greth W, Bancroft T. Epidemiology of systemic sclerosis in a large US managed care population. *J Rheumatol*. 2012; 39 (4): 784–6. DOI: 10.3899/jrheum.111106.
- Horimoto AMC, Matos ENN, Costa MRD, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in Campo Grande, Brazil. *Rev Bras Reumatol (Engl Ed)*. 2017; 57 (2): 107–14. DOI: 10.1016/j.rbre.2016.09.005.
- Hoffmann-Vold AM, Midtvedt Ø, Molberg Ø, Garen T, Gran JT. Prevalence of systemic sclerosis in south-east Norway. *Rheumatology (Oxford)*. 2012; 51 (9): 1600–5. DOI: 10.1093/rheumatology/kes076.
- Bajraktari IH, Berisha I, Berisha M, et al. Incidence, prevalence and clinical manifestations of systemic sclerosis in Dukagjini plain. *Mater Sociomed*. 2013; 25 (1): 14–18. DOI: 10.5455/msm.2013.25.14-18.
- El Adssi H, Cirstea D, Virion JM, Guillemin F, de Korwin JD. Estimating the prevalence of systemic sclerosis in Lorraine, France, by the capture-recapture method. *Semin Arthritis Rheum*. 2013; 42 (5): 530–38. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2012.10.001.
- Meier FM, Frommer KW, Dinser R, et al. EUSTAR Co-authors. Update on the profile of the EUSTAR cohort. *Ann Rheum Dis*. 2012; 71 (8): 1355–60. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200742.
- Matucci-Cerinic M, Krieg T, Guillevin L, et al. Burden of recurrent and chronic digital ulcers in systemic sclerosis: long-term results from the DUO Registry. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75 (10): 1770–6. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-208121.
- Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: EUSTAR database study. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69 (10): 1809–15. DOI: 10.1136/ard.2009.114264.
- Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum*. 2010; 62 (2): 589–98. DOI: 10.1002/art.27224.
- Gasparini G, Cozzani E, Parodi A. Interleukin-4 and interleukin-13 as possible therapeutic targets in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2020; 125: 154799. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154799.
- Wei L, Abraham D, Ong V. The Yin and Yang of IL-17 in systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2022; 13: 885609. DOI: 10.3389/fimmu.2022.885609.
- Skaug B, Assassi S. Type I interferon dysregulation in systemic sclerosis. *Cytokine*. 2020; 132: 154635. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.12.018.
- Farutin V, Pradines JR, Clifone NA, Ghavami A, Kurtagic E, Guess J, et al. Multiomic study of skin, peripheral blood, and serum: is serum proteome a reflection of disease process at the end-organ level in systemic sclerosis? *Arthritis Res Ther*. 2021; 23 (1): 259. DOI: 10.1186/s13075-021-02633-5.
- Насонов Е. Л. Современная концепция аутоиммунитета в ревматологии. *Научно-практическая ревматология*. 2023; 61 (4): 397–420. DOI: 10.47360/1995-4484-2023-397-420.
- Paradowska-Gorycka A, Wajda A, Stypinska B, et al. Endosomal TLRs and interferons expression in SLE, SSc and MCTD. *Clin Exp Immunol*. 2021; 204 (1): 49–63. DOI: 10.1111/cei.13566.
- Yin H, Distler O, Shen L, et al. Endothelial response to type I interferon contributes to vasculopathy and fibrosis and predicts progression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol*. 2024; 76 (1): 78–91. DOI: 10.1002/art.42662. PMID: 37488975.
- Tinazzi I, Mulipa P, Colato C, et al. SFRP4 expression is linked to immune-driven fibrotic conditions and correlates with skin and lung fibrosis in SSc. *J Clin Med*. 2021; 10 (24): 5820. DOI: 10.3390/jcm10245820.
- Насонов Е. Л., Авдеева А. С. Иммуновоспалительные ревматические заболевания, связанные с интерфероном типа I: новые данные. *Научно-практическая ревматология*. 2019; 57 (4): 452–61.
- Авдеева А. С., Четина Е. В., Черкасова М. В., Маркова Г. А., Артохов А. С., Дашинамаев Э. Б., и др. Экспрессия интерферон-стимулированных генов (интерфероновый «автограф») у пациентов с ревматоидным артритом: предварительные результаты. *Научно-практическая ревматология*. 2020; 58 (6): 673–7. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2020-673-677>.
- Авдеева А. С., Четина Е. В., Маркова Г. А., Насонов Е. Л. Экспрессия интерферон-стимулированных генов у пациентов с ревматоидным артритом на фоне анти-В-клеточной терапии (предварительные результаты). *Современная ревматология*. 2021; 15 (5): 12–17.
- Avdeeva AS, Aleksankin AP, Chetina EV, Gorbunova YuN, Popkova TV, Markova GA, et al. Immunophenotypes of systemic lupus erythematosus — features of clinical and laboratory disorders. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2025; 522 (1): 315–22.
- Панафидина Т. А., Попкова Т. В., Горбунова Ю. Н., Кондратьева Л. В., Четина Е. В., Авдеева А. С., и др. Клиническое значение интерферонового статуса у пациентов с системной красной волчанкой. *Научно-практическая ревматология*. 2025; 63 (1): 95–103.
- Алиев Д. Б., Гайдукова И. З. Интерферон-α и особенности системной красной волчанки у пациентов с ювенильным и взрослым началом заболевания. *РМЖ*. 2022; 6: 3–6.
- Авдеева А. С., Четина Е. В., Горбунова Ю. Н., Панафидина Т. А., Попкова Т. В. Интерфероновый «автограф» у пациентов с системной красной волчанкой — взаимосвязь с лабораторными и клиническими показателями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2025; 70 (8): 530–5.
- Brkic Z, van Bon L, Cossu M, van Helden-Meeuwse CG, Vonk MC, Knaapen H, et al. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75 (8): 1567–73. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-207392.
- Kakkar V, Assassi S, Allanore Y, et al. Type 1 interferon activation in systemic sclerosis: a biomarker, a target or the culprit. *Curr Opin Rheumatol*. 2022; 34 (6): 357–64. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000907.
- Mutovina Z, Golovina O, Zhurina T, Zagrebneva A, Shagina I, Myshkin M, et al. Increased type 1 interferon signature in systemic scleroderma patients suggests unexplored therapeutic options. *International Journal of Rheumatic Diseases: Volume 27, Issue S3 Special Issue: APLAR 26th Asia-Pacific League of Associations*

- for Rheumatology Congress, 21–25 August 2024.
33. Del Galdo F, Lescoat A, Conaghan PG, et al. EULAR recommendations for the treatment of SSc: 2023 update. *Ann Rheum Dis.* 2025; 84 (1): 29–40. DOI: 10.1136/ard-2024-226430.
 34. Khanna D, Denton CP, Assassi S, et al. DAISY study design and rationale: anifrolumab in SSc (phase 3). *Clin Exp Rheumatol.* 2024; 42 (8): 1635–44. DOI: 10.55563/clinexp/rheumatol/s8qcyu.
 35. van den Hoogen F, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2013; 65 (11): 2737–47. DOI: 10.1002/art.38098.
 36. Valentini G, et al. EScSG preliminary activity criteria: construct validity. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 901–03. DOI: 10.1136/ard.62.9.901.
 37. Bong D, et al. Brief guide to RT-qPCR. *Molecules and Cells.* 2024; 47 (12): 100141. DOI: 10.1016/j.mocell.2024.100141.
 38. Чудаков Д. М., Турчанинова М. А., Британова О. В., Шагина И. А., Мутовина З. Ю., авторы. Диагностическая тест-система для оценки функционального состояния системы интерферона при аутоиммунных воспалительных заболеваниях. Патент 2845958 от 28.08.2025 г. Доступно по ссылке: <https://fips.ru/EGD/22f31495-c376-4c27-9260-553d619511a9>.
 39. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014; 32: 513–45. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231.
 40. Lozhkov AA, Plotnikova MA, Egorova MA, Baranovskaya IL, Elpaeva EA, Klotchenko SA, et al. Simultaneous Detection of RIG-1, MDA5, and IFIT-1 Expression Is a Convenient Tool for Evaluation of the Interferon-Mediated Response. *Viruses.* 2022; 14 (10): 2090. DOI: 10.3390/v14102090.
 41. Егорова М. А., Плотнокова М. А., Ложков А. А., Власов П. К., Васин А. В., авторы. Многопараметрическая тестовая система для количественного определения мРНК генов RIG-1, IFIT-1, IFIH-1 методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Патент RU2782428C1. 09.03.2023. Доступно по ссылке: <https://patents.google.com/patent/RU2782428C1/ru>.
 42. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70 (11): 2029–36. DOI: 10.1136/ard.2011.150326.
 43. Morand EF, et al. Efficacy of anifrolumab across organ domains in SLE (TULIP-1/2). *Lancet Rheumatol.* 2022; 4 (4): e282–e292. DOI: 10.1016/S2665-9913(21)00317-9.

References

1. Elhai M, Meune C, Avouac J, Kahan A, Allanore Y. Trends in mortality in patients with systemic sclerosis over 40 years: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51 (6): 1017–26. DOI: 10.1093/rheumatology/ker269. PMID: 21900368.
2. Rubio-Rivas M, Royo C, Simeón CP, Corbella X, Fonollosa V. Mortality and survival in systemic sclerosis: systematic review and meta-analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2014; 44 (2): 208–19. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2014.05.010.
3. Nikpour M, Baron M. Mortality in systemic sclerosis: lessons learned from population-based and observational cohort studies. *Curr Opin Rheumatol.* 2014; 26 (2): 131–7. DOI: 10.1097/BOR.000000000000027.
4. Elhai M, Meune C, Boubaya M, et al. EUSTAR group. Mapping and predicting mortality from systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76 (11): 1897–905. DOI: 10.1136/annrheumdis-2017-211448.
5. Rosa JE, Soriano ER, Narvaez-Ponce L, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in a healthcare plan in Buenos Aires. *J Clin Rheumatol.* 2011; 17 (2): 59–63. DOI: 10.1097/RHU.0b013e31820e7e8d.
6. Furst DE, Fernandes AW, Iorga SR, Greth W, Bancroft T. Epidemiology of systemic sclerosis in a large US managed care population. *J Rheumatol.* 2012; 39 (4): 784–6. DOI: 10.3899/jrheum.111106.
7. Horimoto AMC, Matos ENN, Costa MRD, et al. Incidence and prevalence of systemic sclerosis in Campo Grande, Brazil. *Rev Bras Reumatol (Engl Ed).* 2017; 57 (2): 107–14. DOI: 10.1016/j.rbre.2016.09.005.
8. Hoffmann-Vold AM, Midtvedt Ø, Molberg Ø, Garen T, Gran JT. Prevalence of systemic sclerosis in south-east Norway. *Rheumatology (Oxford).* 2012; 51 (9): 1600–5. DOI: 10.1093/rheumatology/kes076.
9. Bajraktari IH, Berisha I, Berisha M, et al. Incidence, prevalence and clinical manifestations of systemic sclerosis in Dukagjini plain. *Mater Sociomed.* 2013; 25 (1): 14–18. DOI: 10.5455/msm.2013.25.14-18.
10. El Adssi H, Cirstea D, Virion JM, Guillemin F, de Korwin JD. Estimating the prevalence of systemic sclerosis in Lorraine, France, by the capture-recapture method. *Semin Arthritis Rheum.* 2013; 42 (5): 530–38. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2012.10.001.
11. Meier FM, Frommer KW, Dinser R, et al. EUSTAR Co-authors. Update on the profile of the EUSTAR cohort. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71 (8): 1355–60. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200742.
12. Matucci-Cerinic M, Krieg T, Guillemin L, et al. Burden of recurrent and chronic digital ulcers in systemic sclerosis: long-term results from the DUO Registry. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75 (10): 1770–6. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-208121.
13. Tyndall AJ, Bannert B, Vonk M, et al. Causes and risk factors for death in systemic sclerosis: EUSTAR database study. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69 (10): 1809–15. DOI: 10.1136/ard.2009.114264.
14. Assassi S, Mayes MD, Arnett FC, et al. Systemic sclerosis and lupus: points in an interferon-mediated continuum. *Arthritis Rheum.* 2010; 62 (2): 589–98. DOI: 10.1002/art.27224.
15. Gasparini G, Cozzani E, Parodi A. Interleukin-4 and interleukin-13 as possible therapeutic targets in systemic sclerosis. *Cytokine.* 2020; 125: 154799. DOI: 10.1016/j.cyto.2019.154799.
16. Wei L, Abraham D, Ong V. The Yin and Yang of IL-17 in systemic sclerosis. *Front Immunol.* 2022; 13: 885609. DOI: 10.3389/fimmu.2022.885609.
17. Skaug B, Assassi S. Type I interferon dysregulation in systemic sclerosis. *Cytokine.* 2020; 132: 154635. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.12.018.
18. Farutin V, Pradines JR, Cilfone NA, Ghavami A, Kurtagic E, Guess J, et al. Multiomic study of skin, peripheral blood, and serum: is serum proteome a reflection of disease process at the end-organ level in systemic sclerosis? *Arthritis Res Ther.* 2021; 23 (1): 259. DOI: 10.1186/s13075-021-02633-5.
19. Nasonov EL. Sovremennaya koncepciya autoimmuniteva v revmatologii. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2023; 61 (4): 397–420. DOI: 10.47360/1995-4484-2023-397-420. Russian.
20. Paradowska-Gorycka A, Wajda A, Stypinska B, et al. Endosomal TLRs and interferons expression in SLE, SSc and MCTD. *Clin Exp Immunol.* 2021; 204 (1): 49–63. DOI: 10.1111/cei.13566.
21. Yin H, Distler O, Shen L, et al. Endothelial response to type I interferon contributes to vasculopathy and fibrosis and predicts progression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheumatol.* 2024; 76 (1): 78–91. DOI: 10.1002/art.42662. PMID: 37488975.
22. Tinazzi I, Mulipa P, Colato C, et al. SFRP4 expression is linked to immune-driven fibrotic conditions and correlates with skin and lung fibrosis in SSc. *J Clin Med.* 2021; 10 (24): 5820. DOI: 10.3390/jcm10245820.
23. Nasonov EL, Avdeeva AS. Immunovospalitel'nye revmaticheskie zabolevaniya, svyazannye s interferonom tipa I: novye dannye. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2019; 57 (4): 452–61. Russian.
24. Avdeeva AS, Chetina EV, Cherkasova MV, Markova GA, Artyuhov AS, Dashinimaev EB, et al. Ekspressiya interferon-stimulirovannykh genov (interferonovoyj «avtograf») u pacientov s revmatoidnym artritom: predvaritel'nye rezul'taty. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya.* 2020; 58 (6): 673–7. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2020-673-677>. Russian.
25. Avdeeva AS, Chetina EV, Markova GA, Nasonov EL. Ekspressiya interferon-stimulirovannykh genov u pacientov s revmatoidnym artritom na fone anti-V-kletочноj terapii (predvaritel'nye rezul'taty) Sovremennaya revmatologiya. 2021; 15 (5): 12–17. Russian.
26. Avdeeva AS, Aleksankin AP, Chetina EV, Gorbunova YuN, Popkova TV, Markova GA, et al. Immunophenotypes of systemic lupus erythematosus — features of clinical and laboratory disorders. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2025; 522 (1): 315–22.
27. Panafidina TA, Popkova TV, Gorbunova YuN, Kondratyeva LV,

- CHetina EV, Avdeeva AS, et al. Klinicheskoe znachenie interferonovogo statusa u pacientov s sistemnoj krasnoj volchankoj. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya*. 2025; 63 (1): 95–103. Russian.
28. Aliev DB, Gajdukova IZ. Interferon- α i osobennosti sistemnoj krasnoj volchanki u pacientov s yuvenil'nym i vzroslym nachalom zabolevaniya. *RMZH*. 2022; 6: 3–6. Russian.
 29. Avdeeva AS, CHetina EV, Gorbunova YuN, Panafidina TA, Popkova TV. Interferonovj «avtograf» u pacientov s sistemnoj krasnoj volchankoj – vzaimosvyaz' s laboratornymi i klinicheskimi pokazatelyami. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2025; 70 (8): 530–5. Russian.
 30. Brkic Z, van Bon L, Cossu M, van Helden-Meeuwssen CG, Vonk MC, Knaapen H, et al. The interferon type I signature is present in systemic sclerosis before overt fibrosis and might contribute to its pathogenesis through high BAFF gene expression and high collagen synthesis. *Ann Rheum Dis*. 2016; 75 (8): 1567–73. DOI: 10.1136/annrheumdis-2015-207392.
 31. Kakkar V, Assassi S, Allanore Y, et al. Type 1 interferon activation in systemic sclerosis: a biomarker, a target or the culprit. *Curr Opin Rheumatol*. 2022; 34 (6): 357–64. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000907.
 32. Mutovina Z, Golovina O, Zhurina T, Zagrebneva A, Shagina I, Myshkin M, et al. Increased type 1 interferon signature in systemic scleroderma patients suggests unexplored therapeutic options. *International Journal of Rheumatic Diseases: Volume 27, Issue S3 Special Issue: APLAR 26th Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 21–25 August 2024*.
 33. Del Galdo F, Lescoat A, Conaghan PG, et al. EULAR recommendations for the treatment of SSc: 2023 update. *Ann Rheum Dis*. 2025; 84 (1): 29–40. DOI: 10.1136/ard-2024-226430.
 34. Khanna D, Denton CP, Assassi S, et al. DAISY study design and rationale: anifrolumab in SSc (phase 3). *Clin Exp Rheumatol*. 2024; 42 (8): 1635–44. DOI: 10.55563/clinexprheumatol/s8qcyu.
 35. van den Hoogen F, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2013; 65 (11): 2737–47. DOI: 10.1002/art.38098.
 36. Valentini G, et al. EScSG preliminary activity criteria: construct validity. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 901–03. DOI: 10.1136/ard.62.9.901.
 37. Bong D, et al. Brief guide to RT-qPCR. *Molecules and Cells*. 2024; 47 (12): 100141. DOI: 10.1016/j.mocell.2024.100141.
 38. Chudakov DM, Turchaninova MA, Britanova OV, Shagina IA, Mutovina ZYu, avtory. Diagnosticheskaya test-sistema dlya ocenki funkcional'nogo sostoyaniya sistemy interferona pri autoimunnyh vospalitel'nyh zabolevaniyah. Patent 2845958 ot 28.08.2025 g. Dostupno po ssylke: <https://fips.ru/EGD/22f31495-c376-4c27-9260-553d619511a9>. Russian.
 39. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32: 513–45. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231.
 40. Lozhkov AA, Plotnikova MA, Egorova MA, Baranovskaya IL, Elpaeva EA, Klotchenko SA, et al. Simultaneous Detection of RIG-1, MDA5, and IFIT-1 Expression Is a Convenient Tool for Evaluation of the Interferon-Mediated Response. *Viruses*. 2022; 14 (10): 2090. DOI: 10.3390/v14102090.
 41. Egorova MA, Plotnikova MA, Lozhkov AA, Vlasov PK, Vasin AV, avtory. Mnogoparametricheskaya testovaya sistema dlya kolichestvennogo opredele niya mRNK genov RIG-1, IFIT-1, IFIH-1 metodom OT-PCR v real'nom vremeni. Patent RU2782428C1. 09.03.2023. Dostupno po ssylke: <https://patents.google.com/patent/RU2782428C1/ru>. Russian.
 42. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Ann Rheum Dis*. 2011; 70 (11): 2029–36. DOI: 10.1136/ard.2011.150326.
 43. Morand EF, et al. Efficacy of anifrolumab across organ domains in SLE (TULIP-1/2). *Lancet Rheumatol*. 2022; 4 (4): e282–e292. DOI: 10.1016/S2665-9913(21)00317-9.

ИЗМЕНЕНИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО И ЛИЗОСОМНОГО КОМПАРТМЕНТОВ В УСЛОВИЯХ ХИМИОИНДУЦИРОВАННОЙ СЕНЕСЦЕНТНОСТИ

Р. О. Шаталова, Д. В. Шевырев ✉

Научный центр трансляционной медицины, Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Старение связано с накоплением сенесцентных клеток, для которых характерно изменение функций, укорочение теломер, остановка клеточного цикла, устойчивость к апоптозу и метаболические нарушения. В последние годы широко изучают различные аспекты сенесцентности не только в контексте старения, но и в отношении терапии опухолей, так как сенесцентность в различных клетках опухоли может по-разному влиять на ход патологического процесса. Целью исследования было провести сравнительный анализ распространенных химиотерапевтических препаратов в контексте индукции сенесцентности и влияния на митохондриальный и лизосомный компартменты фибробластов, выделенных из кожи мышей линии C57BL/6. Сенесцентность клеток оценивали с помощью хромогенного и флуоресцентного методов определения активности фермента β -Gal. Окрашивание митохондрий проводили с использованием потенциалазависимого красителя MitoTracker® Orange, лизосомы окрашивали с помощью LysoTracker® Red. Для анализа использовали проточный цитометр BD LSRFortessa. В результате было выявлено значительное снижение митохондриального потенциала и усиление интенсивности флуоресценции лизосом в клетках с химиоиндуцированной сенесцентностью. Использование разработанного нами интегрального индекса индукции сенесцентности позволило установить, что влияние доxorубина с точки зрения индукции сенесцентности и влияния на митохондриальный и лизосомный компартменты выражено сильнее, чем у цисплатина, блеомицина и этопозидов.

Ключевые слова: сенесцентность, β -галактозидаза, SA- β -Gal, митохондрии, лизосомы, доxorубин, цисплатин, блеомицин, этопозид

Финансирование: данная работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, проект № 24-15-20003 <https://rscf.ru/project/24-15-20003/> (дата доступа 03 сентября 2025 г.).

Вклад авторов: Р. О. Шаталова — отработка условий культивирования, окрашивание клеток; Д. В. Шевырев — оформление рукописи, проведение проточной цитометрии, обработка данных цитометрии, статистическая обработка данных, концептуализация.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом университета «Сириус» (протокол заседания № 7.1 от 12 апреля 2024 г.), проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

✉ **Для корреспонденции:** Даниил Вадимович Шевырев
Олимпийский проспект, д. 1, г. Сочи, 354349, Россия; dr.daniil25@mail.ru; shevyrev.dv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 06.09.2025 **Статья принята к печати:** 06.10.2025 **Опубликована онлайн:** 19.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.045

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/>).

ALTERATIONS IN MITOCHONDRIAL AND LYSOSOMAL COMPARTMENTS UNDER CHEMOTHERAPY-INDUCED SENESCENCE

Shatalova RO, Shevyrev DV ✉

Translational Medicine Research Center, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Krai, Russia

Cellular senescence is associated with the accumulation of senescent cells characterized by functional alterations, telomere shortening, cell cycle arrest, resistance to apoptosis, and metabolic dysregulation. In recent years, senescence has been extensively investigated not only in the context of aging but also in relation to cancer therapy, as senescence induction in various tumor cell types may differentially influence disease progression. The aim of this study was to comparatively evaluate commonly used chemotherapeutic agents with respect to their ability to induce senescence and their effects on mitochondrial and lysosomal compartments in primary dermal fibroblasts isolated from C57BL/6 mice. Cellular senescence was assessed using both chromogenic and fluorescent assays for β -galactosidase (β -Gal) activity. Mitochondria were labeled with the potential-sensitive dye MitoTracker® Orange, and lysosomes were stained with LysoTracker® Red. Flow cytometry analysis was performed using a BD LSRFortessa cytometer. Our results revealed a significant decrease in mitochondrial membrane potential and an increase in lysosomal fluorescence intensity in cells undergoing chemotherapy-induced senescence. Using an integrative senescence induction index developed in our laboratory, we demonstrated that doxorubicin exerts a more pronounced effect on senescence induction and on mitochondrial and lysosomal compartments compared to cisplatin, bleomycin, and etoposide.

Keywords: senescence, β -galactosidase, SA- β -Gal, mitochondria, lysosomes, doxorubicin, cisplatin, bleomycin, etoposide

Funding: This work was supported by Russian Science Foundation, Project No. 24-15-20003 (<https://rscf.ru/project/24-15-20003/> accessed September 3, 2025).

Author contribution: Shatalova RO — optimization of cell culture conditions, cell staining; Shevyrev DV — manuscript preparation, flow cytometry experiments, cytometry data processing, statistical analysis, conceptualization.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Ethics Committee of Sirius University (Protocol No. 7.1, April 12, 2024) and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Daniil V. Shevyrev
1 Olimpiyskiy Avenue, Sochi, 354349, Russia; Email: dr.daniil25@mail.ru; shevyrev.dv@talantiuspeh.ru

Received: 06.09.2025 **Accepted:** 06.10.2025 **Published online:** 19.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.045

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 последние годы интерес к изучению клеточного старения и сенесцентности значительно возрос. Возрастное накопление сенесцентных клеток приводит к нарушению тканевых функций, а на системном уровне — к вялотекущему воспалению из-за продукции сенесцентными клетками ряда воспалительных факторов SASP (от англ. senescence associated secretory phenotype) [1, 2]. В отношении онкологических процессов роль сенесцентности двойственна — она может способствовать остановке роста опухоли, но при этом поддерживать выживание опухолевых клеток и создавать благоприятные условия для метастазирования [3, 4]. Например, сенесцентные опухоль-ассоциированные фибробласты формируют провоспалительное, ангиогенное и метаболически активное микроокружение, которое способствует выживанию и прогрессированию опухоли [5, 6]. Переход в сенесцентность может происходить под влиянием различных стрессов — от пролиферативного истощения до воздействия негативных физических, химических и биологических факторов, вызывающих различные нарушения в молекулярном аппарате клетки [7]. Метаболические сдвиги, которые происходят в сенесцентных клетках, связаны с нарушением работы митохондрий и переходом к анаэробному гликолизу, а также с нарушением процессов аутофагии [8, 9]. Снижение экспрессии генов FIS1, DRP1, MFF, отвечающих за разделение митохондрий, наряду с усилением экспрессии генов слияния MFN1 и MFN2 приводит к нарушению митохондриальной динамики в сенесцентных клетках [10, 11]. Результатом является увеличение массы митохондрий с формированием трубчатой митохондриальной сети, что в целом повышает устойчивость к окислительному стрессу через PINK1-опосредованный путь [12]. Иногда такие изменения рассматривают как один из способов адаптации к клеточному стрессу, и когда на начальных этапах перехода в сенесцентное состояние аэробная активность митохондрий еще сохранена, увеличение массы митохондрий создает риск избыточной продукции активных форм кислорода (АФК). Таким образом, подобное изменение морфологии митохондрий само по себе провоцирует клеточный стресс и способствует формированию провоспалительного фенотипа SASP [13]. Дальнейшее развитие митохондриальной дисфункции связано со снижением интенсивности окислительного фосфорилирования и переходом к анаэробному гликолизу, что отражается в снижении мембранного потенциала митохондрий, приводит к снижению продукции АТФ и повышенному образованию АФК [14]. Избыток АФК и дефицит АТФ снижают активность вакуолярной АТФазы, что ведет к повышению рН лизосом и нарушает работу кислых гидролаз (протеаз, липаз и нуклеаз) [15, 16]. Вследствие этого снижается эффективность аутофагии, происходит накопление поврежденных белков и органелл (в том числе митохондрий), что в свою очередь усугубляет клеточный стресс [17]. Стресс-индуцированная активация PI3K/Akt-пути, аутокринное влияние факторов SASP и накопление поврежденных белков активирует фактор mTOR, который в свою очередь подавляет активность главного регулятора биогенеза и регенерации лизосом — TFEB [18]. Это приводит к нарушению деградации содержимого аутофагосом и в клетке накапливаются поврежденные зацелоченные лизосомы, которые перестают перерабатывать поврежденный материал и выступают скорее в роли хранилища [15, 19]. Гипертрофия лизосомного аппарата сопровождается компенсаторным повышением активности β -галактозидазы, которая

начинает проявлять активность в неоптимальном рН, близком к 6,0 (ассоциированная с сенесцентностью β -галактозидаза — SA- β -Gal) [20]. Это позволяет использовать оценку активности этого фермента в качестве маркера сенесцентных клеток [21].

В настоящее время существуют различные модели для изучения сенесцентности, как *in vivo*, так и *in vitro*. Цель данной работы — провести сравнительный анализ препаратов для химиотерапии (доксорубин, цисплатин, блеомицин и этопозид) по способности индуцировать сенесцентность в культуре фибробластов кожи мышей, а также изучить сопутствующие изменения в митохондриальном и лизосомном компартментах, которые отражают ключевые аспекты метаболического и функционального состояния клеток и имеют большое значение для формирования и поддержания сенесцентного фенотипа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали первичные фибробласты кожи, полученные от мышей линии C57BL/6 в возрасте 4 и 19 месяцев (самцы). Животных содержали в виварии при 12-часовом световом цикле и обеспечивали неограниченным доступом к воде и стандартным сбалансированным лабораторным кормом. Эвтаназию осуществляли в соответствии с принципами гуманного обращения с лабораторными животными: под глубокой анестезией, индуцированной изофлураном, с последующей цервикальной дислокацией. Сразу после процедуры проводили забор необходимых биологических материалов. Анализ проводили на клетках молодых и старых мышей, так как предварительные тесты не выявили различий у клеток, полученных от мышей разного возраста, но находящихся на одном пассаже.

Выделение фибробластов кожи

Эвтаназию мышей проводили опытные специалисты с помощью цервикальной дислокации. Спинку выщипывали триммером для животных, затем проводили дезинфекцию кожи 70%-м этанолом с экспозицией 2 мин до полного высыхания спирта. Участок кожи 2 × 2 см аккуратно отделяли с помощью стерильных ножниц и помещали в стерильный раствор холодного PBS с 1%-м раствором пенициллина-стрептомицина и 0,1%-м раствором хлоргексидина на 5 мин. Затем кожу промывали стерильным PBS и переносили в чашку Петри с холодным PBS. С помощью стерильных инструментов аккуратно удаляли подкожную жировую клетчатку, после чего лоскут кожи измельчали до фрагментов размером 1 мм². Дальнейшую диссоциацию проводили в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением коллагеназы IV до финальной концентрации 0,2% (Gibco, США) при 37 °C в течение 3 ч с периодическим помешиванием. После инкубации инактивацию фермента проводили добавлением 100%-й фетальной бычьей сыворотки FBS (Capricorn Scientific, Германия) до финальной концентрации 20%. Полученную суспензию фильтровали через сито с диаметром пор 40 мкм и отмывали центрифугированием в течение 5 мин при ускорении 300 g. Осадок мягко ресуспендировали и высевали клетки в шестилуночные адгезионные планшеты (Fudau Biotech, Китай) в среде DMEM/F12 с 10% FBS и 1%-м раствором пенициллина-стрептомицина. Клетки инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ и пересевали по достижении конfluence 85%.

Оценка активности SA-β-Gal

Активность SA-β-Gal оценивали с помощью хромогенного субстрата β-галактозидазы — 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид (X-Gal), который при гидролизе ферментом приобретает интенсивное синее окрашивание. β-Галактозидаза присутствует в лизосомах большинства клеток и действует в оптимальном pH~4,2. Поэтому для селективного обнаружения сенесцентных клеток с повышенной активностью этого фермента окрашивание проводили при pH~6,0. Для этого клетки отмывали раствором PBS и фиксировали в 0,2%-м растворе глутаральдегида в течение 10 мин при комнатной температуре с последующим отмыванием раствором PBS. Окрашивание проводили в растворе со следующими концентрациями: 2-мМ цитратно-фосфатный буфер (pH 6,0), 50 мМ K₃[Fe(CN)₆], 50 мМ K₄[Fe(CN)₆], 5 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂ и 20 мг/мл X-Gal (в ДМСО) («СибЭнзим», Россия). После добавления окрашивающего буфера клетки переносили в термостат и инкубировали при 37 °С (атмосферный воздух) в течение 20–24 ч. Затем клетки дважды отмывали раствором PBS и визуализировали с помощью микроскопа AxioScope 5 (Carl Zeiss, Германия). Процентное содержание SA-β-Gal-позитивных клеток определяли вручную, подсчет проводился минимум в 3 полях зрения трех независимых лунок для каждого условия культивирования.

Для оценки активности SA-β-Gal в живых фибробластах использовали витальный краситель SPiDER-βGal Cellular Senescence Detection Kit (Dojindo Laboratories, Япония), который также представляет собой флуоресцентный субстрат, специфичный для β-Gal. Для этого фибробласты, культивируемые в 24-луночном планшете (NEST Biotechnologies, Китай), инкубировали в 1 мл полной среды в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С с добавлением бафиломицина A1, который зашелачивает лизосомы, подавляя активность вакуолярной АТФазы. Далее к клеткам добавляли субстрат SPiDER в конечной концентрации 1 мкмоль/л и инкубировали при тех же условиях на протяжении 1 ч. Избыток субстрата отмывали раствором PBS. Клетки снимали раствором трипсина-ЭДТА 0,25% и анализировали на проточном цитометре BD LSRFortessa (США).

Индукция сенесцентности

Для индукции сенесцентности использовали препараты для химиотерапии злокачественных заболеваний — доксорубин, цисплатин, блеомицин и этопозид. Доксорубин — это противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, механизм действия которого связан с интеркаляцией между цепями ДНК и подавлением топоизомеразы II, что приводит к остановке репликации. Кроме того, доксорубин усиливает выработку свободных радикалов хинонового типа, а также вытесняет гистоны из транскрипционно активного хроматина [22]. В целом его действие приводит к повреждению ДНК, а также транскриптомным и эпигенетическим нарушениям. Клетки чувствительны к препарату в S- и G2-фазах [22]. Цисплатин — это алкилирующий цитотоксический препарат, который вызывает образование внутринитевых и межнитевых сшивок ДНК, что приводит к нарушению репликации и транскрипции. Цисплатин вызывает остановку на стадии G1-, S- или G2-фазы клеточного цикла [23]. Блеомицин — это противоопухолевый препарат из группы гликопептидных

антибиотиков, который вызывает разрывы цепочек ДНК, по-видимому, благодаря продукции свободных радикалов. Блеомицин блокирует раннюю стадию G2-фазы клеточного цикла [24]. Этопозид — противоопухолевый препарат, который связывается с топоизомеразой II и блокирует ее действие. Это нарушает восстановление разрывов цепей ДНК, созданных топоизомеразой II для релаксации суперспиралей ДНК. Этопозид преимущественно действует в фазах G2 и S клеточного цикла [25]. В целом данные препараты вызывают генотоксический стресс — один из основных факторов развития сенесцентности. По данным литературы для каждого индуктора был выбран диапазон тестируемых концентраций: для доксорубина — 250, 350 и 450 нМ, для цисплатина — 5, 10 и 20 мкМ, для блеомицина — 10, 14 и 25 мкМ, для этопозиды — 5, 10 и 20 мкМ. Для всех индукторов в средних и высоких концентрациях наблюдали выраженный цитотоксический эффект и гибель большинства клеток в первые 3–4 дня культивирования, что не соответствовало целям исследования. Анализ жизнеспособности проводили на лазерном микроскопе EVOSTM M5000 (ThermoFisher Scientific, США) при помощи акридинового оранжевого АО (визуализирует все ядросодержащие клетки) и пропидия йодида PI (окрашивает мертвые клетки). При низких дозах цитотоксический эффект был менее выражен, большинство клеток выживало и приобретало признаки сенесцентных, что подтверждалось окрашиванием на X-Gal. В итоге была выбрана минимальная из тестируемых концентраций для каждого индуктора, когда жизнеспособность на 7-й день составляла более 95%. Клетки высевали в 24-луночные планшеты в среду DMEM/F12 («ПанЭко», Россия), содержащую 10% FBS (Capricorn Scientific, Германия), 2 мМ L-глутамин и 1% пенициллина-стрептомицина («ПанЭко», Россия), и инкубировали при температуре 37 °С и 5% CO₂ до достижения 60–70% конфлюэнтности. Затем среду меняли на 1% FBS и в соответствующие лунки вносили индукторы в итоговых концентрациях: 250 нМ раствор доксорубина, 5 мкМ раствор цисплатина, 10 мкМ раствор блеомицина и 5 мкМ раствор этопозиды. Инкубировали в стандартных условиях в течение 24 ч, затем тщательно отмывали и продолжали инкубировать в течение 6 дней в среде DMEM/F12 с 1% FBS, 2 мМ L-глутамина и 1% пенициллина-стрептомицина, обновление среды проводили каждые три дня. Также использовали контроли — культивирование в 10% FBS и в 1% FBS без добавления индукторов. Далее проводили окрашивание на X-Gal, SPiDER, а также окрашивание мито- и лизотрекерами.

Окрашивание митохондрий и лизосом

Окрашивание митохондрий проводили в 24-луночных планшетах (NEST Biotechnologies, Китай) с помощью потенциалзависимого красителя MitoTracker Orange CMTM Ros (Invitrogen, США) в концентрации 0,4 μМ в среде DMEM/F12, содержащей 1% FBS, в инкубаторе при 37 °С и атмосфере 5% CO₂ в течение 30 минут. MitoTracker Orange свободно диффундирует через мембраны живых клеток и избирательно накапливается в активных митохондриях в зависимости от мембранного потенциала. Окрашивание лизосом проводили в аналогичных условиях с помощью ацидотропного флуоресцентного зонда LysoTracker® Red DND-99 (Invitrogen, США) в концентрации 50 нМ, который в нейтральной среде свободно проникает через мембраны живых клеток. В кислой среде лизосом слабоосновная

часть протонируется и зонд теряет способность свободно проходить через мембраны. Это обеспечивает локальное накопление и четкое окрашивание кислых органелл, таких как лизосомы.

После окрашивания клетки снимали раствором трипсина-ЭДТА 0,25% и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Статистический анализ

Обработку данных проточной цитометрии проводили с помощью программного обеспечения BD FACSDiva v9.0 и пакета программ FlowJo 10.8.1. Анализировали не менее 500 событий на образец, среднее число событий на образец составляло 2500. Статистический анализ данных проводили с помощью программы GraphPad Prism 9.3.1. Проверку выборок на соответствие распределению Гаусса осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова. Множественное сравнение выборок проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим апостериорным анализом тестом Шидака. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения (Mean \pm SD) для нормальных распределений и медианы и интерквартильного размаха (Me \pm IQR), если распределение не соответствовало распределению Гаусса.

Для сравнения выраженности воздействия препаратов мы применили интегральный индекс индукции сенесцентности (IISI), позволяющий комплексно оценить выраженность сенесцентного фенотипа по активности SA- β -Gal с учетом влияния на митохондрии и лизосомы клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При анализе индукции сенесцентности в первичных фибробластах кожи мыши с использованием хромогенного субстрата X-Gal было установлено, что все четыре индуктора — доксорубин, цисплатин, блеомицин и этопозид — достоверно повышают долю сенесцентных клеток по сравнению с контролем (рис. 1).

А

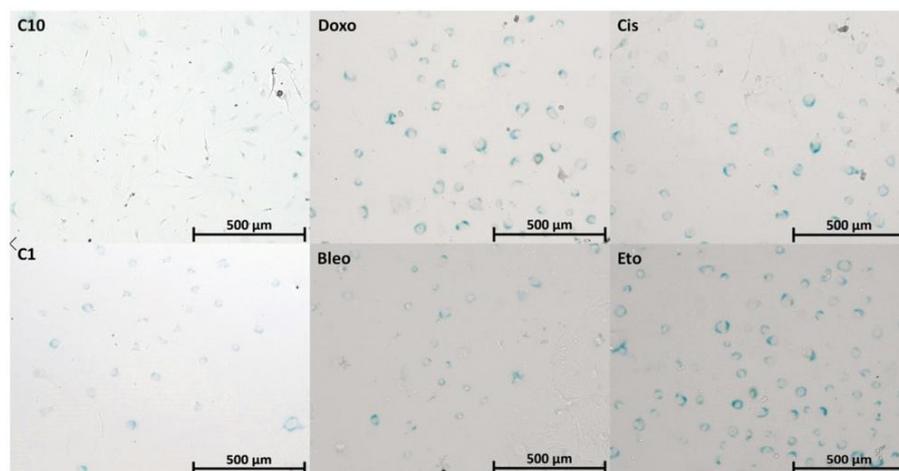


Рис. 1. А. Пример визуализации хромогенного окрашивания X-Gal в разных условиях культивирования. C10 — культивирование в 10% FBS, C1 — культивирование в 1% FBS, Doxo — доксорубин, Cis — цисплатин, Bleo — блеомицин, Eto — этопозид. **Б.** Сравнительный анализ содержания SA- β -Gal-позитивных клеток в различных условиях культивирования (ANOVA, post hoc — тест Шидака, обсчет в девяти полях зрения в трех независимых лунках для каждого условия; Mean \pm SD; ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,005$, **** — $p < 0,001$)

Характерное синее окрашивание локализовалось преимущественно в цитоплазме фибробластов вокруг ядра и было равномерно выражено для всех индукторов (рис. 1А). Примечательно, что в условиях сывороточного голодания также наблюдалось повышение числа SA- β -Gal-позитивных клеток ($39 \pm 12\%$) в сравнении с культивированием при нормальном содержании сыворотки ($23 \pm 11\%$). Тем не менее, во всех условиях, где применяли индукторы, содержание SA- β -Gal-положительных клеток было значительно выше ($60\text{--}87\%$) и под воздействием доксорубина достигало $87,8 \pm 4,5\%$ (рис. 1Б).

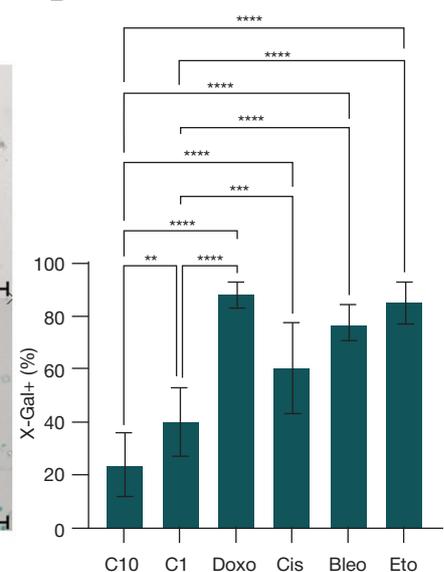
На следующем этапе проводили анализ индукции сенесцентности с помощью флуорогенного субстрата SPiDER в живых клетках методом проточной цитометрии. При оценке содержания SA- β -Gal-позитивных клеток границы популяции определяли по негативному контролю с бафиломицином A1 без добавления флуорогенного субстрата SPiDER. Результаты были сопоставимы с использованием X-Gal и паттерны распределения SA- β -Gal-позитивных клеток под воздействием индукторов были аналогичны при оценке двумя независимыми методами (рис. 2А, Б).

При оценке митохондриального компартмента были выявлены любопытные изменения (рис. 2В, Г). Интенсивность флуоресценции в канале детекции митотрекера (561-585/15) была относительно высокой при культивировании в полной среде, но в условиях сывороточного голодания значительно возрастала. При этом под воздействием индукторов сенесцентности ожидаемо происходило значимое снижение интенсивности флуоресценции, которое было особенно выраженным для доксорубина.

Изменения затронули и лизосомный компартмент — при культивировании в нормальных условиях и при сывороточном голодании интенсивность флуоресценции в канале детекции лизотрекера (561-610/20) была сопоставимой, в то время как под воздействием индукторов значительно возрастала, достигая наибольших значений под влиянием доксорубина и этопозид (рис. 2Д, Е).

Для оценки влияния индукторов по трем показателям одновременно — содержания SA- β -Gal-позитивных

Б



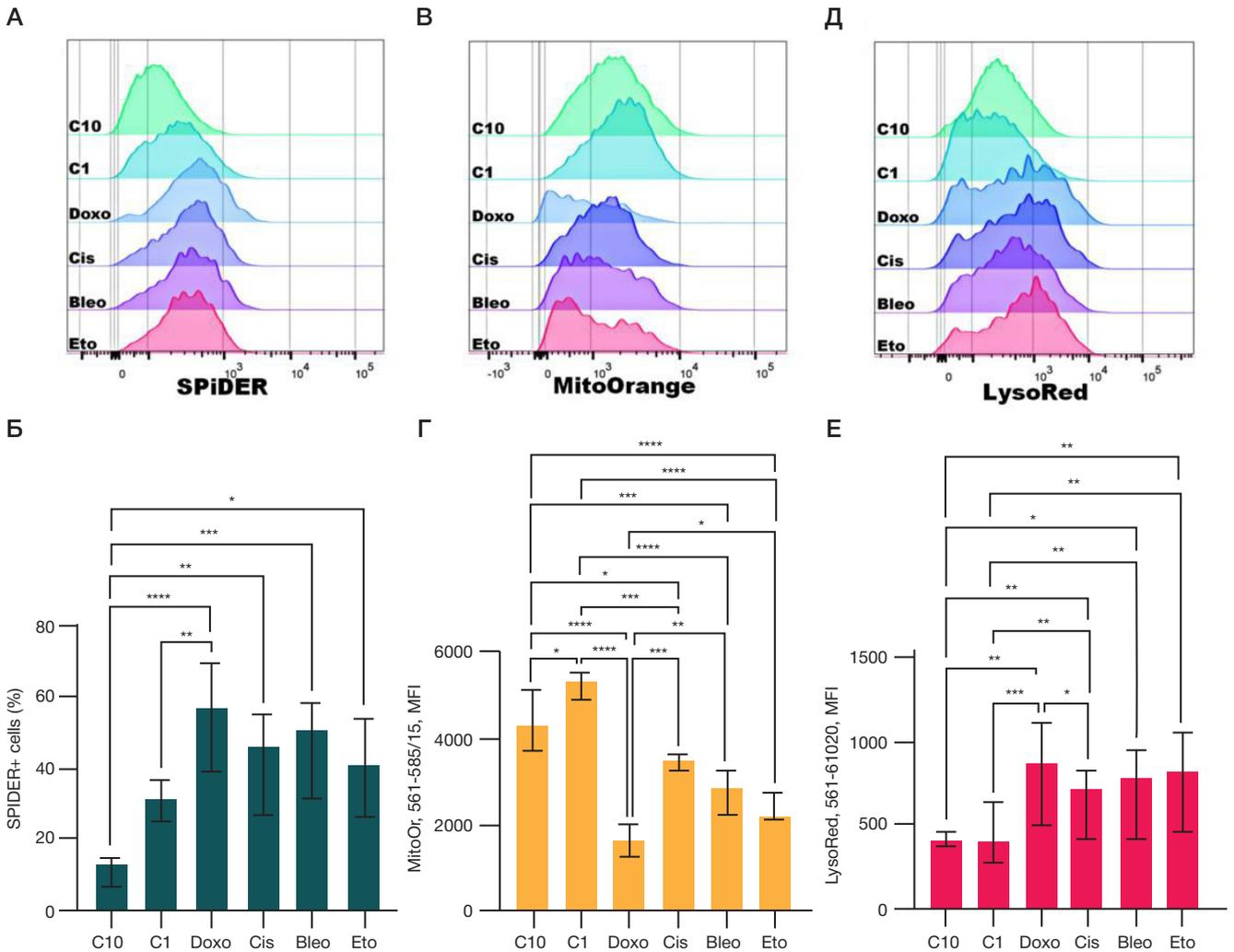


Рис. 2. В верхнем ряду представлены гистограммы распределения SA-β-Gal-позитивных клеток по SPiDER (A), при окрашивании митохондрий с помощью MitoOrange (B), а также при окрашивании лизосом зондом LysoRed (D). Гистограммы отражают контрольные условия (C10 — культивирование в 10% FBS, C1 — культивирование в 1% FBS) и воздействие индукторов (Doxo — доксорубин, Cis — цисплатин, Bleo — блеомицин, Eto — этопозид). Для построения гистограмм использовали объединенные образцы для каждого условия культивирования — по четыре образца в каждом условии для фибробластов, полученных от каждой из двух мышей. В целом распределения на гистограммах отражают повышение содержания SA-β-Gal-позитивных клеток, снижение митохондриального потенциала и гипертрофию лизосомального аппарата под влиянием индукторов сенесцентности, что согласуется с результатами статистического анализа. Нижний ряд: статистический анализ содержания SA-β-Gal-позитивных клеток по SPiDER (E), оценка активности митохондрий по MitoOrange (F) и оценка лизосомного компартмента по LysoRed (G). Объем выборки для каждого варианта окрашивания и каждого условия культивирования составил $n = 12$ (по 6 независимых реплик для фибробластов, полученных от каждой из двух мышей). Анализ реплик проводили в разные дни; $Me \pm IQR$; * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,005$, **** — $p < 0,001$

клеток, снижения митохондриального потенциала и степени гипертрофии лизосомного аппарата — нами был разработан интегральный индекс индукции сенесцентности (IISI):

$$IISI = \frac{\%SPiDER_i^+}{\%SPiDER_{C1}^+} \times \left(\frac{MFI_{C10}^{mito}}{MFI_{C1}^{mito}} + \frac{MFI_{lyso}}{MFI_{C10}^{lyso}} \right),$$

где $\%SPiDER_i^+$ и $\%SPiDER_{C1}^+$ — это содержание SA-β-Gal-позитивных клеток под влиянием конкретного индуктора сенесцентности и в условиях сывороточного голодания соответственно. MFI_{C10}^{mito} и MFI_{C1}^{mito} — медианы интенсивности флуоресценции митотрекера в контроле с 10% FBS и в условиях индукции сенесцентности соответственно. MFI_{lyso} и MFI_{C10}^{lyso} — медианы интенсивности флуоресценции лизотрекера в условиях индукции сенесцентности и в контроле с 10% FBS соответственно.

Использование IISI позволило установить, что в наших условиях среди всех индукторов наибольшее влияние по всем трем показателям оказывает доксорубин (рис. 3).

Таким образом, нами был проведен сравнительный анализ изменений митохондриального и лизосомного аппаратов в первичных фибробластах мыши в контексте химиотерапевтической индукции сенесцентности, где влияние доксорубина оказалось наиболее значимым. Тем не менее, стоит отметить, что данный индекс является инструментом сравнительного анализа в условиях данной работы и его абсолютное значение не интерпретируется.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании с помощью двух независимых методов детекции сенесцентности — хромогенного окрашивания X-Gal и флуорогенного субстрата SPiDER мы подтвердили, что доксорубин, цисплатин, блеомицин и этопозид достоверно увеличивают долю SA-β-Gal-позитивных клеток, что свидетельствует о развитии химиоиндуцированной сенесцентности [26]. Наиболее выраженный эффект наблюдался под воздействием доксорубина, который значительно повышал долю

X-Gal-позитивных клеток ($87,8 \pm 4,5\%$) и демонстрировал наибольшую активность в интегральной оценке по разработанному нами индексу индукции сенесцентности (IIS).

Любопытно, что в условиях сывороточного голодания также происходило повышение содержания SA- β -Gal-позитивных клеток. Это согласуется с тем, что снижение митогенной стимуляции и пролиферативной активности может сопровождаться фенотипическими признаками старения даже в отсутствие экзогенных повреждающих факторов [27]. По-видимому, это связано с тем, что сыворотка содержит антиоксидантные системы (альбумин, глутатион, аскорбиновую кислоту, токоферолы и др.) [28], и при длительном сывороточном голодании антиоксидантная емкость среды истощается, а вследствие базального уровня митохондриального дыхания возникает избыток АФК, который не может быть эффективно нейтрализован. Это может приводить к генотоксическому стрессу и вызывать переход клеток в сенесцентное состояние [28, 29]. Интересно, что в таких условиях также происходило значительное повышение сигнала от потенциалзависимого красителя митохондрий MitoTracker Orange, что, по-видимому, отражает процесс адаптации к условиям метаболического стресса (за счет сниженной концентрации инсулина в среде с низкой концентрацией сыворотки) через интенсификацию аэробного гликолиза [30, 31]. Стоит отметить, что воздействие индукторов происходило также в условиях сывороточного голодания, но приводило к значимому снижению сигнала от потенциалзависимого красителя митохондрий MitoTracker Orange, особенно под воздействием доксорубицина. Кроме того, изменение флуоресцентного сигнала от красителя MitoTracker Orange может быть связано, как с изменением мембранного потенциала митохондрий ($\Delta\Psi_m$) и с изменением митохондриальной массы. По-видимому, снижение сигнала под воздействием индукторов связано в первую очередь со снижением митохондриального потенциала, что перекрывает эффект от возможного увеличения массы митохондрий. Такое состояние типично для устойчивой сенесцентности, когда большое число нефункциональных митохондрий не может обеспечить необходимый уровень продукции АТФ и клетка переходит к получению энергии через анаэробный гликолиз [32, 33]. Последнее связывают с выделением в окружающую среду такими клетками ряда промежуточных продуктов метаболизма: лактата, пирувата, аланина и др., которые могут использоваться соседними опухолевыми клетками в качестве дополнительных источников энергии [34].

Сывороточное голодание *in vitro*, как и другие формы метаболического стресса и энергетического дефицита, активирует TFEB (от англ. transcription factor EB) благодаря активации АМПК и подавления mTORC1 [35, 36]. Это обеспечивает адаптацию клеток через активацию аутофагии и других процессов, в ходе которых происходит переработка клеточных компонентов, что обеспечивает клетки энергией и необходимыми веществами, поддерживая их жизнеспособность [37]. В наших условиях сывороточное голодание не приводило к достоверному усилению сигнала от LysoTracker Red. По-видимому, это связано с интенсификацией процессов биогенеза и обновления лизосом в условиях сывороточного голодания [38, 39]. При этом под влиянием всех индукторов наблюдалось значительное увеличение сигнала от лизотрекера, что скорее всего свидетельствует о значимом увеличении массы лизосомного аппарата, которое перекрывает эффект от возможного зашестачивания

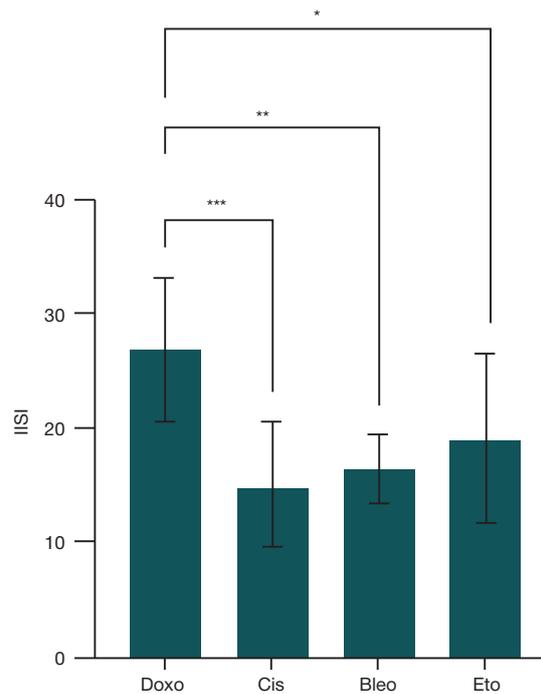


Рис. 3. Сравнительный анализ интегрального индекса индукции сенесцентности (IIS), который отражает суммарный эффект воздействия каждого индуктора по трем оцениваемым показателям. Doxo — доксорубицин, Cis — цисплатин, Bleo — блеомицин, Eto — этопозид. Mean \pm SD, $n = 8$; * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,005$

лизосом и связанного с ним снижения накопления ацидотропного зонда LysoTracker Red. Стоит отметить, что гипертрофия лизосомного аппарата — это типичный признак сенесцентных клеток, который возникает для компенсации лизосомных нарушений [40]. Наибольший эффект отмечался под воздействием доксорубицина. Что наряду с повышенной долей SA- β -Gal-позитивных клеток подтверждает концепцию о том, что накопление лизосом является не просто побочным явлением, а функциональной чертой сенесцентного состояния, связанной с истощением адапционного резерва клеток [41].

Доксорубицин оказал наиболее выраженный эффект по совокупности параметров, превосходя другие препараты. По-видимому, это связано с многокомпонентным механизмом его действия: интеркаляция в ДНК, ингибирование топоизомеразы II, генерация АФК и повреждение митохондриальной ДНК [22]. Таким образом, доксорубицин оказался наиболее эффективным индуктором сенесцентности в культуре первичных фибробластов мыши и имел наиболее выраженное токсическое действие в отношении митохондрий.

Современная онкология все чаще сталкивается с проблемой двойственности действия различных химиотерапевтических агентов [42, 43]. Эффективная остановка роста опухоли может быть одновременно сопряжена с запуском процессов, которые способствуют рецидиву, метастазированию и развитию побочных эффектов [44–46]. Центральным элементом этого парадокса, по-видимому, является баланс между прямой цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток и индукцией сенесцентности как в опухоли, так и в нормальных тканях [6, 45]. С одной стороны, развитие сенесцентности в опухоли может сохранять опухолевые клетки, обеспечивать их дополнительными питательными веществами, обеспечивать ангиогенез и условия для метастазирования [5, 6]. С другой стороны, сенесцентность

обеспечивает устойчивую остановку пролиферации опухолевых клеток, а воспалительные факторы SASP могут привлекать клетки иммунной системы и повышать эффективность иммунобиологического надзора [47–49]. Поэтому необходимы дальнейшие *in vitro* и *in vivo* исследования, направленные не только на изучение цитотоксического потенциала противоопухолевых агентов, но и на оценку их «сеногенного» и иммуногенного потенциалов.

Выводы

В ходе данного исследования было показано, что все тестируемые химиотерапевтические агенты (доксорубин, цисплатин, блеомицин и этопозид) способны эффективно индуцировать сенесцентность в первичных фибробластах кожи мыши. Это подтверждается достоверным увеличением доли SA- β -Gal-позитивных клеток как при использовании хромогенного окрашивания X-Gal, так и при оценке с помощью флуорогенного субстрата SPiDER в живых клетках. Наиболее выраженный эффект наблюдался при обработке доксорубином, который приводил к формированию сенесцентного фенотипа у 87,5% клеток (X-Gal). Сывороточное голодание также способствовало повышению содержания с признаками

сенесцентности, однако в значительно меньшей степени по сравнению с индукторами. Параллельно с активацией SA- β -Gal было выявлено снижение митохондриального мембранного потенциала и гипертрофия лизосомного аппарата — ключевые признаки сенесцентного фенотипа, наиболее ярко проявлявшиеся под действием доксорубина и этопозидов. Для комплексной оценки эффективности индукторов был разработан интегральный индекс индукции сенесцентности (IISI), объединяющий три ключевых параметра: долю сенесцентных клеток, состояние митохондрий и лизосом. Согласно этому индексу, доксорубин продемонстрировал наибольшую способность индуцировать сенесцентность по совокупности всех показателей. Полученные данные подчеркивают различия в потенциале химиотерапевтических агентов вызывать сенесцентность и указывают на доксорубин как наиболее мощный индуктор среди исследованных соединений в условиях данной модели. Поскольку тестируемые индукторы показали различия в фенотипе сенесцентности фибробластов, изучение их иммуногенности может быть ключевым для разработки иммунологически обоснованных терапевтических стратегий, так как иммуномодулирующая активность химиотерапевтических препаратов не менее значима, чем их цитотоксичность.

Литература

1. Aquino-Martinez R, Eckhardt BA, Rowsey JL, Fraser DG, Khosla S, Farr JN, Monroe DG. Senescent cells exacerbate chronic inflammation and contribute to periodontal disease progression in old mice. *J Periodontol.* 2021; 92 (10): 1483–95. DOI: 10.1002/JPER.20-0529. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33341947; PMCID: PMC8281492.
2. Tripathi U, Misra A, Tchkonja T, Kirkland JL. Impact of Senescent Cell Subtypes on Tissue Dysfunction and Repair: Importance and Research Questions. *Mech Ageing Dev.* 2021; 198: 111548. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111548. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34352325; PMCID: PMC8373827.
3. Schosserer M, Grillari J, Breitenbach M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2017; 7: 278. DOI: 10.3389/fonc.2017.00278. PMID: 29218300; PMCID: PMC5703792.
4. Ma L, Yu J, Fu Y, He X, Ge S, Jia R, et al. The dual role of cellular senescence in human tumor progression and therapy. *MedComm (2020).* 2024; 5 (9): e695. DOI: 10.1002/mco2.695. PMID: 39161800; PMCID: PMC11331035.
5. Coppé JP, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem.* 2006; 281 (40): 29568–74. DOI: 10.1074/jbc.M603307200. Epub 2006 Jul 31. PMID: 16880208.
6. Luo J, Sun T, Liu Z, Liu Y, Liu J, Wang S, et al. Persistent accumulation of therapy-induced senescent cells: an obstacle to long-term cancer treatment efficacy. *Int J Oral Sci.* 2025; 17 (1): 59. DOI: 10.1038/s41368-025-00380-w. PMID: 40750580; PMCID: PMC12317027.
7. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 645593. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593. PMID: 33855023; PMCID: PMC8039141.
8. Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Olivieri F, Procopio AD, Rippo MR, Giuliani A. Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells. *Front Physiol.* 2019; 10: 1523. DOI: 10.3389/fphys.2019.01523. PMID: 31920721; PMCID: PMC6930181.
9. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N, Rubinsztein DC, Partridge L, Kroemer G, Labbadia J, Fang EF. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021; 1 (8): 634–50. DOI: 10.1038/s43587-021-00098-4. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34901876; PMCID: PMC8659158.
10. Panfilova A, Zubareva T, Mironova E, Mazzocchi G, Marasco MGP, Balazovskaia S, et al. Mitochondrial proteins as biomarkers of cellular senescence and age-associated diseases. *Aging (Albany NY).* 2025; 17. DOI: 10.18632/aging.206305. Epub ahead of print. PMID: 40856658.
11. Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8 (1): 333. DOI: 10.1038/s41392-023-01547-9. PMID: 37669960; PMCID: PMC10480456.
12. Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0142438. DOI: 10.1371/journal.pone.0142438. PMID: 26555609; PMCID: PMC4640816.
13. Zlotorynski E. Defective mitochondria ignite the SASP. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21 (4): 179. DOI: 10.1038/s41580-020-0228-x. PMID: 32076133.
14. Suski JM, Lebedzinska M, Bonora M, Pinton P, Duszyński J, Wieckowski MR. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol.* 2012; 810: 183–205. DOI: 10.1007/978-1-61779-382-0_12. PMID: 22057568.
15. Li W, Kawaguchi K, Tanaka S, He C, Maeshima Y, Suzuki E, Toi M. Cellular senescence triggers intracellular acidification and lysosomal pH alkalinized via ATP6AP2 attenuation in breast cancer cells. *Commun Biol.* 2023; 6 (1): 1147. DOI: 10.1038/s42003-023-05433-6. PMID: 37993606; PMCID: PMC10665353.
16. Song Q, Meng B, Xu H, Mao Z. The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent lysosomal acidification in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener.* 2020; 9 (1): 17. DOI: 10.1186/s40035-020-00196-0. PMID: 32393395; PMCID: PMC7212675.
17. Chung CY, Shin HR, Berdan CA, Ford B, Ward CC, Olzmann JA, et al. Covalent targeting of the vacuolar H⁺-ATPase activates autophagy via mTORC1 inhibition. *Nat Chem Biol.* 2019; 15 (8): 776–85. DOI: 10.1038/s41589-019-0308-4. Epub 2019 Jul 8. PMID: 31285595; PMCID: PMC6641988.
18. Omolekan TO, Chamcheu JC, Buerger C, Huang S. PI3K/AKT/mTOR Signaling Network in Human Health and Diseases.

- Cells. 2024; 13 (17): 1500. DOI: 10.3390/cells13171500. PMID: 39273070; PMCID: PMC11394329.
19. Loo TM, Zhou X, Tanaka Y, Sugawara S, Yamauchi S, Kawasaki H, et al. Senescence-associated lysosomal dysfunction impairs cystine deprivation-induced lipid peroxidation and ferroptosis. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 6617. DOI: 10.1038/s41467-025-61894-9. PMID: 40731111; PMCID: PMC12307602.
 20. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 20): 3613–22. DOI: 10.1242/jcs.113.20.3613. PMID: 11017877.
 21. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (20): 9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. PMID: 7568133; PMCID: PMC40985.
 22. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, et al. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells.* 2023; 12 (4): 659. DOI: 10.3390/cells12040659. PMID: 36831326; PMCID: PMC9954613.
 23. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364–78. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25058905; PMCID: PMC4146684.
 24. Dorr RT. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol.* 1992; 19 (2 Suppl 5): 3–8. PMID: 1384141.
 25. Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* 2015; 14: 95–108. DOI: 10.17179/excli2015-561. PMID: 26600742; PMCID: PMC4652635.
 26. Lubberts S, Meijer C, Demaria M, Gietema JA. Early ageing after cytotoxic treatment for testicular cancer and cellular senescence: Time to act. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020; 151: 102963. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102963. Epub 2020 May 7. PMID: 32446180.
 27. Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab.* 2021; 3 (10): 1290–301. DOI: 10.1038/s42255-021-00483-8. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34663974; PMCID: PMC8889622.
 28. Zhang Y, Xu YY, Sun WJ, Zhang MH, Zheng YF, Shen HM, et al. FBS or BSA Inhibits EGCG Induced Cell Death through Covalent Binding and the Reduction of Intracellular ROS Production. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 5013409. DOI: 10.1155/2016/5013409. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27830147; PMCID: PMC5088332.
 29. Stival A, Silva A, Valadares M. Qualitative and quantitative evaluation of Fetal Bovine Serum composition: toward ethical and best quality in vitro science. *NAM Journal.* 2025. doi.org/10.1016/j.namjnl.2025.100047.
 30. Liu Y, Birsos K. Metabolic sensing and control in mitochondria. *Mol Cell.* 2023; 83 (6): 877–89. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.02.016. PMID: 36931256; PMCID: PMC10332353.
 31. Choi EJ, Oh HT, Lee SH, Zhang CS, Li M, Kim SY, et al. Metabolic stress induces a double-positive feedback loop between AMPK and SQSTM1/p62 conferring dual activation of AMPK and NFE2L2/NRF2 to synergize antioxidant defense. *Autophagy.* 2024; 20 (11): 2490–510. DOI: 10.1080/15548627.2024.2374692. Epub 2024 Jul 10. PMID: 38953310; PMCID: PMC11572134.
 32. Fumagalli M, Rossiello F, Mondello C, d'Adda di Fagnagna F. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110969. DOI: 10.1371/journal.pone.01110969. PMID: 25340529; PMCID: PMC4207795.
 33. Ajoolabady A, Pratico D, Bahijri S, Eldakhakhny B, Tuomilehto J, Wu F, et al. Hallmarks and mechanisms of cellular senescence in aging and disease. *Cell Death Discov.* 2025; 11 (1): 364. DOI: 10.1038/s41420-025-02655-x. PMID: 40759632; PMCID: PMC12322153.
 34. Dou X, Fu Q, Long Q, Liu S, Zou Y, Fu D, et al. PDK4-dependent hypercatabolism and lactate production of senescent cells promotes cancer malignancy. *Nat Metab.* 2023; 5 (11): 1887–910. DOI: 10.1038/s42255-023-00912-w. Epub 2023 Oct 30. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (5): 980. DOI: 10.1038/s42255-024-01054-3. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (7): 1416. DOI: 10.1038/s42255-024-01069-w. PMID: 37903887; PMCID: PMC10663165.
 35. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (4): 251–62. DOI: 10.1038/nrm3311. PMID: 22436748; PMCID: PMC5726489.
 36. Zhang S, Sheng H, Zhang X, Qi Q, Chan CB, Li L, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of glioblastoma cell proliferation by PIKE-A phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (3): 222. DOI: 10.1038/s41419-019-1452-1. Erratum in: *Cell Death Dis.* 2025; 16 (1): 447. DOI: 10.1038/s41419-025-07700-2. PMID: 30833542; PMCID: PMC6399291.
 37. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (12): 4788–93. DOI: 10.1073/pnas.1100844108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383122; PMCID: PMC3064373.
 38. Lee C, Lamech L, Johns E, Overholtzer M. Selective Lysosome Membrane Turnover Is Induced by Nutrient Starvation. *Dev Cell.* 2020; 55 (3): 289–97.e4. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.08.008. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32916093; PMCID: PMC8337093.
 39. Ebner M, Puchkov D, López-Ortega O, Muthukottiappan P, Su Y, Schmied C, et al. Nutrient-regulated control of lysosome function by signaling lipid conversion. *Cell.* 2023; 186 (24): 5328–46.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2023.09.027. Epub 2023 Oct 25. Erratum in: *Cell.* 2025; 188 (9): 2560. DOI: 10.1016/j.cell.2025.04.009. PMID: 37883971.
 40. Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66 (15): 2503–24. DOI: 10.1007/s00018-009-0034-2. Epub 2009 May 7. PMID: 19421842; PMCID: PMC11115533.
 41. Tan JX, Finkel T. Lysosomes in senescence and aging. *EMBO Rep.* 2023; 24 (11): e57265. DOI: 10.15252/embr.202357265. Epub 2023 Oct 9. PMID: 37811693; PMCID: PMC10626421.
 42. D'Alterio C, Scala S, Sozzi G, Roz L, Bertolini G. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin Cancer Biol.* 2020; 60: 351–61. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.019. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31454672.
 43. Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, Khani P, Hosseini A, Garssen J, Falak R. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 507–26. DOI: 10.1007/s00262-021-03013-3. Epub 2021 Aug 5. Erratum in: *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 527. DOI: 10.1007/s00262-021-03034-y. PMID: 34355266; PMCID: PMC10992618.
 44. Middleton JD, Stover DG, Hai T. Chemotherapy-Exacerbated Breast Cancer Metastasis: A Paradox Explainable by Dysregulated Adaptive-Response. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3333. DOI: 10.3390/ijms19113333. PMID: 30373101; PMCID: PMC6274941.
 45. Hwang HJ, Kang D, Shin J, Jung J, Ko S, Jung KH, et al. Therapy-induced senescent cancer cells contribute to cancer progression by promoting ribophorin 1-dependent PD-L1 upregulation. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 353. DOI: 10.1038/s41467-024-54132-1. PMID: 39753537; PMCID: PMC11699195.
 46. Guillon J, Petit C, Toutain B, Guette C, Lelièvre E, Coqueret O. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle.* 2019; 18 (19): 2385–97. DOI: 10.1080/15384101.2019.1652047. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31397193; PMCID: PMC6738909.
 47. Jiao D, Zheng X, Du X, Wang D, Hu Z, Sun R, et al. Immunogenic senescence sensitizes lung cancer to LUNX-targeting therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (6): 1403–17. DOI: 10.1007/s00262-021-03077-1. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34674012; PMCID: PMC9123058.
 48. Liu Y, Lomeli I, Kron SJ. Therapy-Induced Cellular Senescence: Potentiating Tumor Elimination or Driving Cancer Resistance and Recurrence? *Cells.* 2024; 13 (15): 1281. DOI: 10.3390/cells13151281. PMID: 39120312; PMCID: PMC11312217.
 49. Marin I, Boix O, Garcia-Garajo A, Sirois I, Caballe A, Zarzuela E, et al. Cellular Senescence Is Immunogenic and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Discov.* 2023; 13 (2): 410–31. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0523. PMID: 36302218; PMCID: PMC7614152.

References

- Aquino-Martinez R, Eckhardt BA, Rowsey JL, Fraser DG, Khosla S, Farr JN, Monroe DG. Senescent cells exacerbate chronic inflammation and contribute to periodontal disease progression in old mice. *J Periodontol.* 2021; 92 (10): 1483–95. DOI: 10.1002/JPER.20-0529. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33341947; PMCID: PMC8281492.
- Tripathi U, Misra A, Tchkonja T, Kirkland JL. Impact of Senescent Cell Subtypes on Tissue Dysfunction and Repair: Importance and Research Questions. *Mech Ageing Dev.* 2021; 198: 111548. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111548. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34352325; PMCID: PMC8373827.
- Schosserer M, Grillari J, Breitenbach M. The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2017; 7: 278. DOI: 10.3389/fonc.2017.00278. PMID: 29218300; PMCID: PMC5703792.
- Ma L, Yu J, Fu Y, He X, Ge S, Jia R, et al. The dual role of cellular senescence in human tumor progression and therapy. *MedComm (2020).* 2024; 5 (9): e695. DOI: 10.1002/mco2.695. PMID: 39161800; PMCID: PMC11331035.
- Coppé JP, Kauser K, Campisi J, Beauséjour CM. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem.* 2006; 281 (40): 29568–74. DOI: 10.1074/jbc.M603307200. Epub 2006 Jul 31. PMID: 16880208.
- Luo J, Sun T, Liu Z, Liu Y, Liu J, Wang S, et al. Persistent accumulation of therapy-induced senescent cells: an obstacle to long-term cancer treatment efficacy. *Int J Oral Sci.* 2025; 17 (1): 59. DOI: 10.1038/s41368-025-00380-w. PMID: 40750580; PMCID: PMC12317027.
- Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 645593. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593. PMID: 33855023; PMCID: PMC8039141.
- Sabbatinelli J, Prattichizzo F, Olivieri F, Procopio AD, Rippon MR, Giuliani A. Where Metabolism Meets Senescence: Focus on Endothelial Cells. *Front Physiol.* 2019; 10: 1523. DOI: 10.3389/fphys.2019.01523. PMID: 31920721; PMCID: PMC6930181.
- Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, Simonsen A, Johansen T, Tavernarakis N, Rubinsztein DC, Partridge L, Kroemer G, Labbadia J, Fang EF. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021; 1 (8): 634–50. DOI: 10.1038/s43587-021-00098-4. Epub 2021 Aug 12. PMID: 34901876; PMCID: PMC8659158.
- Panfilova A, Zubareva T, Mironova E, Mazzoccoli G, Marasco MGP, Balazovskaia S, et al. Mitochondrial proteins as biomarkers of cellular senescence and age-associated diseases. *Aging (Albany NY).* 2025; 17. DOI: 10.18632/aging.206305. Epub ahead of print. PMID: 40856658.
- Chen W, Zhao H, Li Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8 (1): 333. DOI: 10.1038/s41392-023-01547-9. PMID: 37669960; PMCID: PMC10480456.
- Murata H, Takamatsu H, Liu S, Kataoka K, Huh NH, Sakaguchi M. NRF2 Regulates PINK1 Expression under Oxidative Stress Conditions. *PLoS One.* 2015; 10 (11): e0142438. DOI: 10.1371/journal.pone.0142438. PMID: 26555609; PMCID: PMC4640816.
- Zlotorynski E. Defective mitochondria ignite the SASP. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21 (4): 179. DOI: 10.1038/s41580-020-0228-x. PMID: 32076133.
- Suski JM, Lebieczińska M, Bonora M, Pinton P, Duszynski J, Wieckowski MR. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol.* 2012; 810: 183–205. DOI: 10.1007/978-1-61779-382-0_12. PMID: 22057568.
- Li W, Kawaguchi K, Tanaka S, He C, Maeshima Y, Suzuki E, Toi M. Cellular senescence triggers intracellular acidification and lysosomal pH alkalinized via ATP6AP2 attenuation in breast cancer cells. *Commun Biol.* 2023; 6 (1): 1147. DOI: 10.1038/s42003-023-05433-6. PMID: 37993606; PMCID: PMC10665353.
- Song Q, Meng B, Xu H, Mao Z. The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent Lysosomal acidification in neurodegenerative diseases. *Transl Neurodegener.* 2020; 9 (1): 17. DOI: 10.1186/s40035-020-00196-0. PMID: 32393395; PMCID: PMC7212675.
- Chung CY, Shin HR, Berdan CA, Ford B, Ward CC, Olzmann JA, et al. Covalent targeting of the vacuolar H⁺-ATPase activates autophagy via mTORC1 inhibition. *Nat Chem Biol.* 2019; 15 (8): 776–85. DOI: 10.1038/s41589-019-0308-4. Epub 2019 Jul 8. PMID: 31285595; PMCID: PMC6641988.
- Omolekan TO, Chamcheu JC, Buerger C, Huang S. PI3K/AKT/mTOR Signaling Network in Human Health and Diseases. *Cells.* 2024; 13 (17): 1500. DOI: 10.3390/cells13171500. PMID: 39273070; PMCID: PMC11394329.
- Loo TM, Zhou X, Tanaka Y, Sugawara S, Yamauchi S, Kawasaki H, et al. Senescence-associated lysosomal dysfunction impairs cystine deprivation-induced lipid peroxidation and ferroptosis. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 6617. DOI: 10.1038/s41467-025-61894-9. PMID: 40731111; PMCID: PMC12307602.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 20): 3613–22. DOI: 10.1242/jcs.113.20.3613. PMID: 11017877.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (20): 9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363. PMID: 7568133; PMCID: PMC40985.
- Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, et al. Doxorubicin—An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells.* 2023; 12 (4): 659. DOI: 10.3390/cells12040659. PMID: 36831326; PMCID: PMC9954613.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014; 740: 364–78. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025. Epub 2014 Jul 21. PMID: 25058905; PMCID: PMC4146684.
- Dorr RT. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics. *Semin Oncol.* 1992; 19 (2 Suppl 5): 3–8. PMID: 1384141.
- Montecucco A, Zanetta F, Biamonti G. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* 2015; 14: 95–108. DOI: 10.17179/excli2015-561. PMID: 26600742; PMCID: PMC4652635.
- Lubberts S, Meijer C, Demaria M, Gietema JA. Early ageing after cytotoxic treatment for testicular cancer and cellular senescence: Time to act. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020; 151: 102963. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102963. Epub 2020 May 7. PMID: 32446180.
- Wiley CD, Campisi J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention. *Nat Metab.* 2021; 3 (10): 1290–301. DOI: 10.1038/s42255-021-00483-8. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34663974; PMCID: PMC8889622.
- Zhang Y, Xu YY, Sun WJ, Zhang MH, Zheng YF, Shen HM, et al. FBS or BSA Inhibits EGCG Induced Cell Death through Covalent Binding and the Reduction of Intracellular ROS Production. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 5013409. DOI: 10.1155/2016/5013409. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27830147; PMCID: PMC5088332.
- Stival A, Silva A, Valadares M. Qualitative and quantitative evaluation of Fetal Bovine Serum composition: toward ethical and best quality in vitro science. *NAM Journal.* 2025. doi.org/10.1016/j.namjnl.2025.100047.
- Liu Y, Birsoy K. Metabolic sensing and control in mitochondria. *Mol Cell.* 2023; 83 (6): 877–89. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.02.016. PMID: 36931256; PMCID: PMC10332353.
- Choi EJ, Oh HT, Lee SH, Zhang CS, Li M, Kim SY, et al. Metabolic stress induces a double-positive feedback loop between AMPK and SQSTM1/p62 conferring dual activation of AMPK and NFE2L2/NRF2 to synergize antioxidant defense. *Autophagy.* 2024; 20 (11): 2490–510. DOI: 10.1080/15548627.2024.2374692. Epub 2024 Jul 10. PMID: 38953310; PMCID: PMC11572134.
- Fumagalli M, Rossiello F, Mondello C, d'Adda di Fagagna F. Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e110969. DOI: 10.1371/journal.pone.0110969. PMID: 25340529; PMCID: PMC4207795.

33. Ajoolabady A, Pratico D, Bahjiri S, Eldakhakhny B, Tuomilehto J, Wu F, et al. Hallmarks and mechanisms of cellular senescence in aging and disease. *Cell Death Discov.* 2025; 11 (1): 364. DOI: 10.1038/s41420-025-02655-x. PMID: 40759632; PMCID: PMC12322153.
34. Dou X, Fu Q, Long Q, Liu S, Zou Y, Fu D, et al. PDK4-dependent hypercatabolism and lactate production of senescent cells promotes cancer malignancy. *Nat Metab.* 2023; 5 (11): 1887–910. DOI: 10.1038/s42255-023-00912-w. Epub 2023 Oct 30. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (5): 980. DOI: 10.1038/s42255-024-01054-3. Erratum in: *Nat Metab.* 2024; 6 (7): 1416. DOI: 10.1038/s42255-024-01069-w. PMID: 37903887; PMCID: PMC10663165.
35. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (4): 251–62. DOI: 10.1038/nrm3311. PMID: 22436748; PMCID: PMC5726489.
36. Zhang S, Sheng H, Zhang X, Qi Q, Chan CB, Li L, et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of glioblastoma cell proliferation by PIKE-A phosphorylation. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (3): 222. DOI: 10.1038/s41419-019-1452-1. Erratum in: *Cell Death Dis.* 2025; 16 (1): 447. DOI: 10.1038/s41419-025-07700-2. PMID: 30833542; PMCID: PMC6399291.
37. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108 (12): 4788–93. DOI: 10.1073/pnas.1100844108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383122; PMCID: PMC3064373.
38. Lee C, Lamech L, Johns E, Overholtzer M. Selective Lysosome Membrane Turnover Is Induced by Nutrient Starvation. *Dev Cell.* 2020; 55 (3): 289–97.e4. DOI: 10.1016/j.devcel.2020.08.008. Epub 2020 Sep 10. PMID: 32916093; PMCID: PMC8337093.
39. Ebner M, Puchkov D, López-Ortega O, Muthukottiappan P, Su Y, Schmied C, et al. Nutrient-regulated control of lysosome function by signaling lipid conversion. *Cell.* 2023; 186 (24): 5328–46.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2023.09.027. Epub 2023 Oct 25. Erratum in: *Cell.* 2025; 188 (9): 2560. DOI: 10.1016/j.cell.2025.04.009. PMID: 37883971.
40. Hwang ES, Yoon G, Kang HT. A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66 (15): 2503–24. DOI: 10.1007/s00018-009-0034-2. Epub 2009 May 7. PMID: 19421842; PMCID: PMC11115533.
41. Tan JX, Finkel T. Lysosomes in senescence and aging. *EMBO Rep.* 2023; 24 (11): e57265. DOI: 10.15252/embr.202357265. Epub 2023 Oct 9. PMID: 37811693; PMCID: PMC10626421.
42. D'Alterio C, Scala S, Sozzi G, Roz L, Bertolini G. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin Cancer Biol.* 2020; 60: 351–61. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.08.019. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31454672.
43. Behranvand N, Nasri F, Zolfaghari Emameh R, Khani P, Hosseini A, Garssen J, Falak R. Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 507–26. DOI: 10.1007/s00262-021-03013-3. Epub 2021 Aug 5. Erratum in: *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (3): 527. DOI: 10.1007/s00262-021-03034-y. PMID: 34355266; PMCID: PMC10992618.
44. Middleton JD, Stover DG, Hai T. Chemotherapy-Exacerbated Breast Cancer Metastasis: A Paradox Explainable by Dysregulated Adaptive-Response. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3333. DOI: 10.3390/ijms19113333. PMID: 30373101; PMCID: PMC6274941.
45. Hwang HJ, Kang D, Shin J, Jung J, Ko S, Jung KH, et al. Therapy-induced senescent cancer cells contribute to cancer progression by promoting ribophorin 1-dependent PD-L1 upregulation. *Nat Commun.* 2025; 16 (1): 353. DOI: 10.1038/s41467-024-54132-1. PMID: 39753537; PMCID: PMC11699195.
46. Guillon J, Petit C, Toutain B, Guette C, Lelièvre E, Coqueret O. Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle.* 2019; 18 (19): 2385–97. DOI: 10.1080/15384101.2019.1652047. Epub 2019 Aug 9. PMID: 31397193; PMCID: PMC6738909.
47. Jiao D, Zheng X, Du X, Wang D, Hu Z, Sun R, et al. Immunogenic senescence sensitizes lung cancer to LUNX-targeting therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2022; 71 (6): 1403–17. DOI: 10.1007/s00262-021-03077-1. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34674012; PMCID: PMC9123058.
48. Liu Y, Lomeli I, Kron SJ. Therapy-Induced Cellular Senescence: Potentiating Tumor Elimination or Driving Cancer Resistance and Recurrence? *Cells.* 2024; 13 (15): 1281. DOI: 10.3390/cells13151281. PMID: 39120312; PMCID: PMC11312217.
49. Marin I, Boix O, Garcia-Garijo A, Sirois I, Caballe A, Zarzuela E, et al. Cellular Senescence Is Immunogenic and Promotes Antitumor Immunity. *Cancer Discov.* 2023; 13 (2): 410–31. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-22-0523. PMID: 36302218; PMCID: PMC7614152.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ, ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ВЫСОКОЗЛОКАЧЕСТВЕННОЙ КАРЦИНОМЫ

Д. Р. Махачев , Д. В. Буланов, М. М. Шовхалов, Б. З. Бекмурзиев, И. А. Героев, А. М. Нецветова, А. Р. Жусупова, Д. С. Губич, А. М. Мановски

Российский национальный исследовательский университет имени Н. И. Пирогова (Пироговский Университет), Москва, Россия

Высококвалифицированные неанпластические опухоли щитовидной железы (HGFC-NA) относятся к редкой и агрессивной категории новообразований, занимающих промежуточное положение между дифференцированными и анапластическими карциномами. Имеют место высокая смертность и ограниченные возможности стандартного лечения, которое обычно включает хирургическое удаление опухоли с последующей радиоiodотерапией и супрессивной терапией левотироксином. При радиоiodоустойчивых формах дополнительно рассматривают таргетные тирозинкиназные ингибиторы, однако их эффективность ограничена. Представлен клинический случай дифференцированной высокозлокачественной карциномы (DHGTC) у пациентки 62 лет, перенесшей гемитиреоидэктомию. Используются методы гистологического анализа, иммуногистохимии (TTF-1, PAX8, CK19, p53, Ki-67) и молекулярного тестирования ключевых маркеров (*TERT*, *TP53*, *BRAF*). Опухоль имела размеры 3,4 × 2,8 × 2,5 см, демонстрировала выраженную архитектурную гетерогенность, очаговый некроз, высокую митотическую активность — 8–10 митозов на 10 полей зрения при ×400 (что соответствует ≥ 5 на 2 мм²), а индекс пролиферации Ki-67 достигал 35%. С помощью ИГХ выявлена экспрессия TTF-1 и PAX8, p53 с мутационным типом экспрессии, что указывает на мутацию TP53. Молекулярное исследование не показало изменения в генах *TERT* и *BRAF*. Эти признаки позволили верифицировать диагноз DHGTC. Сделан вывод о необходимости комплексной морфо-молекулярной диагностики HGFC-NA, поскольку количественные параметры митотической активности, Ki-67 и статус *TERT/TP53* определяют прогноз и выбор персонализированной терапии.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, высокозлокачественные неанпластические опухоли, DHGTC, PDTC, Ki-67, *TERT*, *TP53*

Вклад авторов: Д. Р. Махачев, Д. В. Буланов, М. М. Шовхалов, Б. З. Бекмурзиев, И. А. Героев — анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование; А. М. Нецветова, А. Р. Жусупова — написание текста статьи, редактирование; Д. С. Губич, А. М. Мановски — сбор клинических данных, редактирование.

✉ **Для корреспонденции:** Далгат Рамазанович Махачев
ул. Академика Волгина, д. 37, г. Москва, 117437, Россия; dalgat2002@mail.ru

Статья получена: 02.09.2025 **Статья принята к печати:** 15.09.2025 **Опубликована онлайн:** 24.09.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.042

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, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR ANALYSIS OF DIFFERENTIATED HIGH-GRADE CARCINOMA

Makhachev DR , Bulanov DV, Shovkhalov MM, Bekmurziev BZ, Geroev IA, Netsvetova AM, Zhusupova AR, Gubich DS, Manovski AM

Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University), Moscow, Russia

High-grade non-anaplastic (HGFC-NA) thyroid tumors belong to a rare and aggressive category of neoplasms that occupy an intermediate position between differentiated and anaplastic carcinomas. There are high mortality rate and limited standard treatment options, which usually include surgical tumor removal with subsequent radioiodine treatment and levothyroxine suppression therapy. Targeted tyrosine kinase inhibitors are additionally considered in radioiodine-resistant forms, but the efficacy of those is limited. A clinical case of differentiated high-grade thyroid carcinoma (DHGTC) in a 62-year-old female patient post hemithyroidectomy is presented. Histological assessment, immunohistochemistry (TTF-1, PAX8, CK19, p53, Ki-67), and the key marker (*TERT*, *TP53*, *BRAF*) molecular testing methods were used. The tumor size was 3.4 × 2.8 × 2.5 cm; the tumor showed pronounced architectonic heterogeneity, focal necrosis, high mitotic activity — 8–10 mitoses per 10 fields of view at ×400 (corresponding to ≥ 5 per 2 mm²), and the Ki-67 proliferation index reached 35%. IHC was used to detect the TTF-1 and PAX8 expression, mutational p53 pattern of expression, suggesting the TP53 mutation. Molecular testing revealed no alteration of the *TERT* and *BRAF* genes. These characteristics made it possible to verify the diagnosis of DHGTC. A conclusion was drawn about the need for comprehensive morphological and molecular diagnosis of HGFC-NA tumors, since the mitotic activity quantitative parameters, Ki-67, and *TERT/TP53* status determine the prognosis and the personalized therapy selection.

Keywords: thyroid carcinoma, high-grade non-anaplastic tumors, DHGTC, PDTC, Ki-67, *TERT*, *TP53*

Author contribution: FMakhachev DR, Bulanov DV, Shovkhalov MM, Bekmurziev BZ, Geroev IA — data analysis and interpretation, manuscript writing, editing; Netsvetova AM, Zhusupova AR — manuscript writing, editing; Gubich DS, Manovski AM — clinical data acquisition, editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dalgat R. Makhachev
Akademika Volgina, 37, Moscow, 117437, Russia; dalgat2002@mail.ru

Received: 02.09.2025 **Accepted:** 15.09.2025 **Published online:** 24.09.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.042

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/>).

Опухоли фолликулярного происхождения высокой степени злокачественности, не относящиеся к анапластическим (high-grade follicular cell-derived non-anaplastic thyroid carcinomas, HGFC-NA), в последние годы привлекают внимание специалистов эндокринной патологии. Согласно классификации ВОЗ (2022), эта группа выделена в самостоятельную категорию, объединяющую агрессивные

новообразования с тиреоидной дифференцировкой, высокой митотической активностью, очагами некроза и неблагоприятным прогнозом. HGFC-NA занимают промежуточное положение между дифференцированными и анапластическими карциномами [1].

В структуре HGFC-NA различают два подтипа: плохо дифференцированную карциному (poorly differentiated

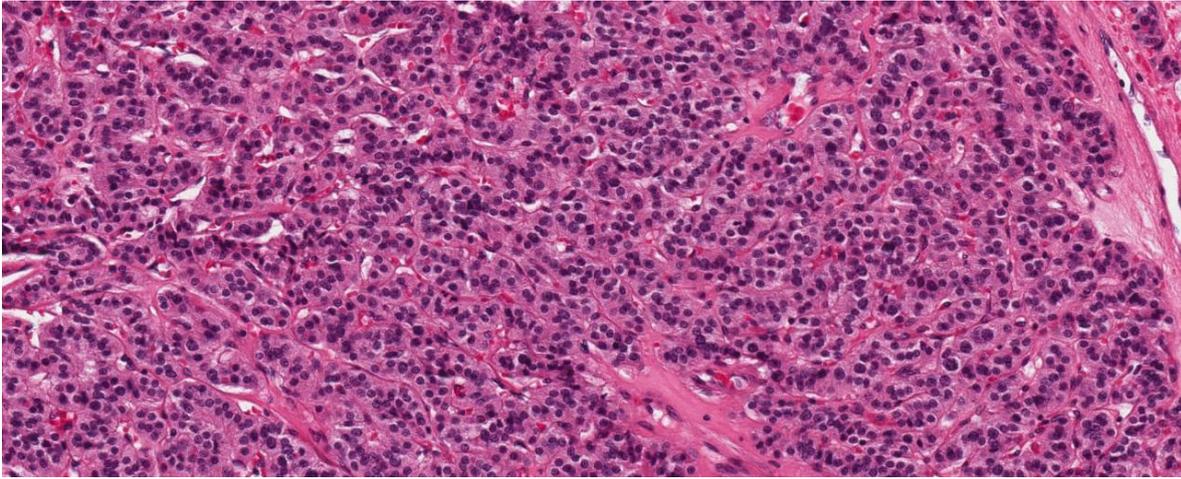


Рис. 1. Плохо дифференцированная карцинома щитовидной железы (PDTC) по критериям Турина. Сolidно-инсулярный рост с тонкими фиброваскулярными перегородками, высокая плотность мелких монотонных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением; отсутствуют характерные для папиллярного рака щитовидной железы ядерные признаки (H&E, ув. ×200)

thyroid carcinoma, PDTC) и дифференцированную высокозлокачественную карциному (differentiated high-grade thyroid carcinoma, DHGTC). Диагностические критерии PDTC, закрепленные в Туринском консенсусе (2006), включают солидную, трабекулярную или инсулярную архитектуру, отсутствие ядерных признаков папиллярной карциномы и ≥ 3 митозов на 2 мм^2 или очаги некроза [2] (рис. 1).

Выделение HGFC-NA имеет значение для уточнения диагноза и выбора тактики, включающей и таргетные подходы. Эти опухоли отражают переходный биологический спектр и требуют комплексной оценки морфологических, иммуногистохимических и молекулярных признаков. HGFC-NA характеризуются солидными, трабекулярными, фолликулярными и склерозирующими структурами, сопровождающимися клеточной атипией, высоким индексом Ki-67 ($> 20\text{--}30\%$) и признаками неоангиогенеза [3–5].

Ключевыми молекулярными нарушениями считают мутации в промоторе *TERT*, *TP53* и *BRAF*. Они ассоциированы с неблагоприятным прогнозом, радиойодрезистентностью и метастазированием. DHGTC может иметь любую морфологическую структуру, включая папиллярную или фолликулярную, но диагностируется при ≥ 5 митозах на 2 мм^2 и/или некрозе, независимо от дифференцировки [6, 7].

Ниже представлен клинический случай DHGTC с морфологическим, иммуногистохимическим и молекулярным анализом.

Описание клинического случая

Пациентка К., 62 лет, поступила с жалобами на увеличение объема шеи, умеренное затруднение глотания и осиплость голоса, нарастающие в течение полугода. В анамнезе — гипертиреоз на фоне терапии тиреостатиками и гипертоническая болезнь II стадии. Семейный онкологический анамнез не отягощен. При осмотре выявлено плотное образование до 3,5 см в правой доле щитовидной железы, смещаемое при глотании.

Инструментальные методы

На УЗИ был обнаружен гипоехогенный узел размером $3,5 \times 2,8$ см с неровными контурами, гиперваскуляризацией и микрокальцинатами. По шкале TI-RADS образование

отнесено к категории 5. КТ шеи не выявило инвазии в окружающие структуры и региональные лимфоузлы. Тонкоигольная аспирационная биопсия классифицирована как Bethesda V (“suspect for malignancy”).

Хирургическое лечение

Выполнена правая гемитиреоидэктомия. Послеоперационный период протекал без осложнений.

Макроскопическое исследование

Опухоль имела серо-белый цвет, плотную консистенцию неправильной дольчатой формы, очаги с некрозом и микрокальцинатами. Размеры опухоли — $3,4 \times 2,8 \times 2,5$ см. На разрезе — чередование солидных зон и участков коагуляционного некроза.

Микроскопическое исследование

Опухоль имела выраженную архитектурную гетерогенность: солидные, трабекулярные и псевдофолликулярные структуры, окруженные тонкими фиброзными перегородками. Ядра клеток гиперхромные, округло-овальные, с умеренной атипией и четкими ядрышками. Митотическая активность была высокой — 8–10 митозов на 10 полей зрения при $\times 400$, что превышает диагностический порог для DHGTC. Дополнительно выявлены очаги коагуляционного некроза и микрососудистая пролиферация с признаками васкулярной инвазии. Характерные ядерные признаки папиллярной карциномы отсутствовали.

Для демонстрации дифференциально-диагностических особенностей приведен пример анапластической карциномы щитовидной железы (АТС), которая морфологически может напоминать высокозлокачественные опухоли, однако отличается более выраженным клеточным плеоморфизмом, наличием гигантских многоядерных клеток и большим числом атипичных митозов (рис. 2).

Совокупность выявленных признаков в нашем случае характерна для солидно-трабекулярной и псевдофолликулярной структуры (рис. 3А), очаги некроза и высокая митотическая активность (рис. 3Б) позволяют с высокой степенью вероятности отнести опухоль к дифференцированной высокозлокачественной карциноме

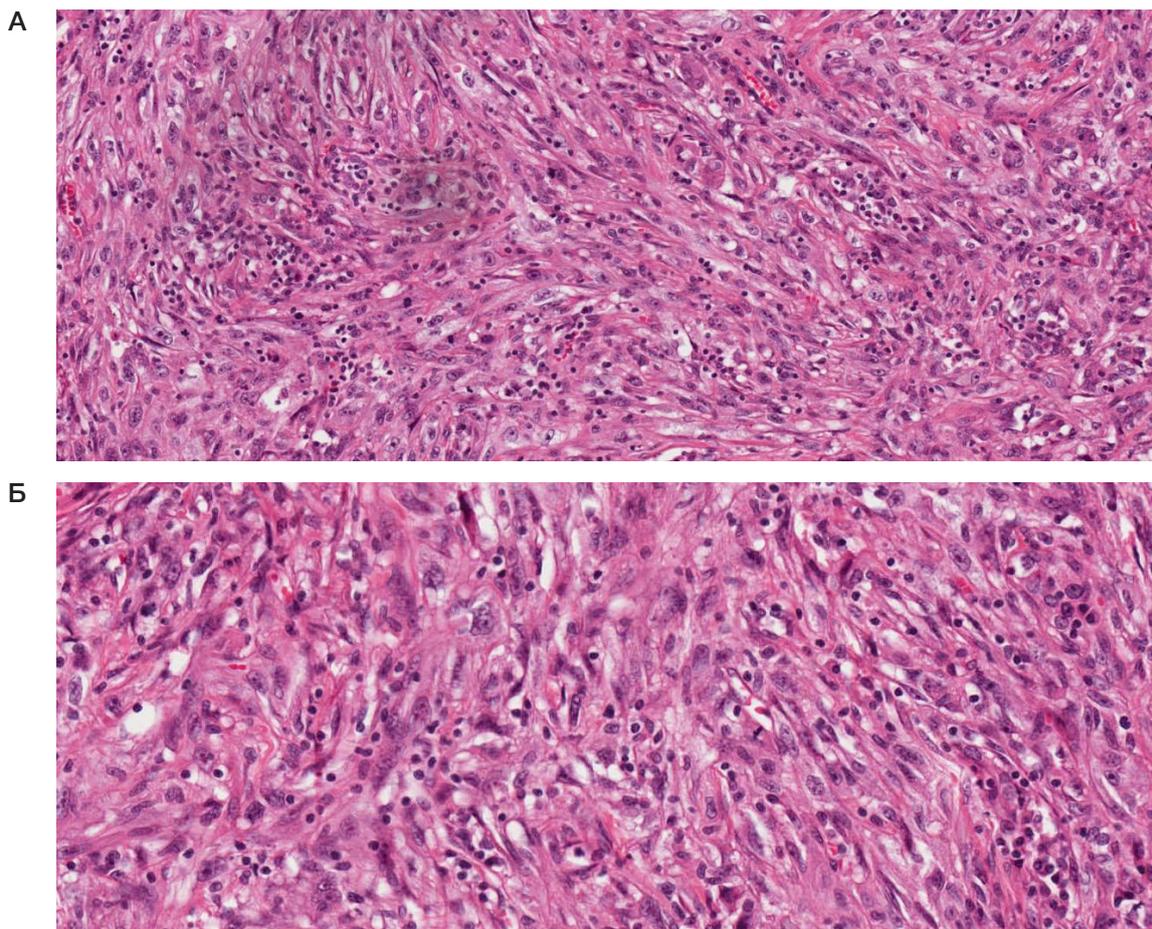


Рис. 2. Анапластическая карцинома щитовидной железы, веретенноклеточный вариант (АТС). **А.** Плотные, разнонаправленные пучки веретенновидных клеток с выраженным ядерным плеоморфизмом, грубодисперсным хроматином (H&E, ув. $\times 100$). **Б.** Высокая клеточность, многочисленные атипичные митозы, единичные многоядерные опухолевые клетки (H&E, ув. $\times 400$)

фолликулярного типа (DHGTC), входящей в группу HGFC-NA. Для окончательной верификации были необходимы дополнительные методы гистологического анализа, расширенной иммуногистохимии (TTF-1, PAX8, CK19, p53, Ki-67) и молекулярного тестирования. Последнее включало исследование мутаций в генах *TERT*, *TP53* и *BRAF* методом NGS-панели с подтверждением по Сэнгеру.

Иммуногистохимический анализ

Опухолевые клетки экспрессировали TTF-1 и PAX8, что подтверждало происхождение из фолликулярных клеток. Индекс Ki-67 достигал 35%. Отмечены экспрессия Galectin-3 и очаговая реакция HBME-1; кальцитонин и тиреоглобулин не определялись.

Молекулярное исследование

В опухоли выявлена мутация *TP53* с мутационным типом экспрессии p53, тогда как мутации *TERT* и *BRAF V600E* не обнаружены. Профиль, в совокупности с морфологией и иммуногистохимическим анализом, подтвердил диагноз DHGTC, относящейся к группе HGFC-NA.

Обсуждение клинического случая

HGFC-NA представляют собой недавно выделенную категорию с высокой диагностической сложностью. Они занимают промежуточное положение между

дифференцированными и анапластическими карциномами, сочетая тиреоидную дифференцировку с агрессивным биологическим поведением [8, 9].

Ключевая морфологическая особенность HGFC-NA — выраженная архитектоническая гетерогенность. В одной опухоли могут сочетаться солидные, трабекулярные, псевдофолликулярные и склерозирующие структуры, что затрудняет диагностику, особенно при малых биопсиях [10]. Согласно классификации ВОЗ (2022), решающими критериями являются наличие ≥ 5 митозов на 2 мм^2 , очаговый некроз и индекс Ki-67 $> 20\%$ при сохранении тиреоидной дифференцировки. В представленном случае индекс Ki-67 достигал 35%, а выявленная мутация *TP53* указывает на неблагоприятный прогноз [11].

С молекулярной точки зрения HGFC-NA характеризуются геномной нестабильностью. Наиболее значимы мутации в промоторе *TERT* (35–40% случаев), ассоциированные с радиойодрезистентностью, изменения *TP53* (20–25%), отражающие геномную нестабильность, и мутации *BRAF V600E*, встречающиеся реже, преимущественно при DHGTC, что может определять чувствительность к ингибиторам MAPK-каскада [12].

В нашем случае молекулярный анализ выявил мутацию *TP53*, и ее наличие подтверждает неблагоприятное прогностическое значение, тогда как мутации *TERT* и *BRAF V600E* отсутствовали. Эти результаты согласуются с литературными данными, где подчеркивается, что наличие сочетанных мутаций *TERT* и *TP53* значительно ухудшает прогноз, а изолированная *TP53*-мутация также

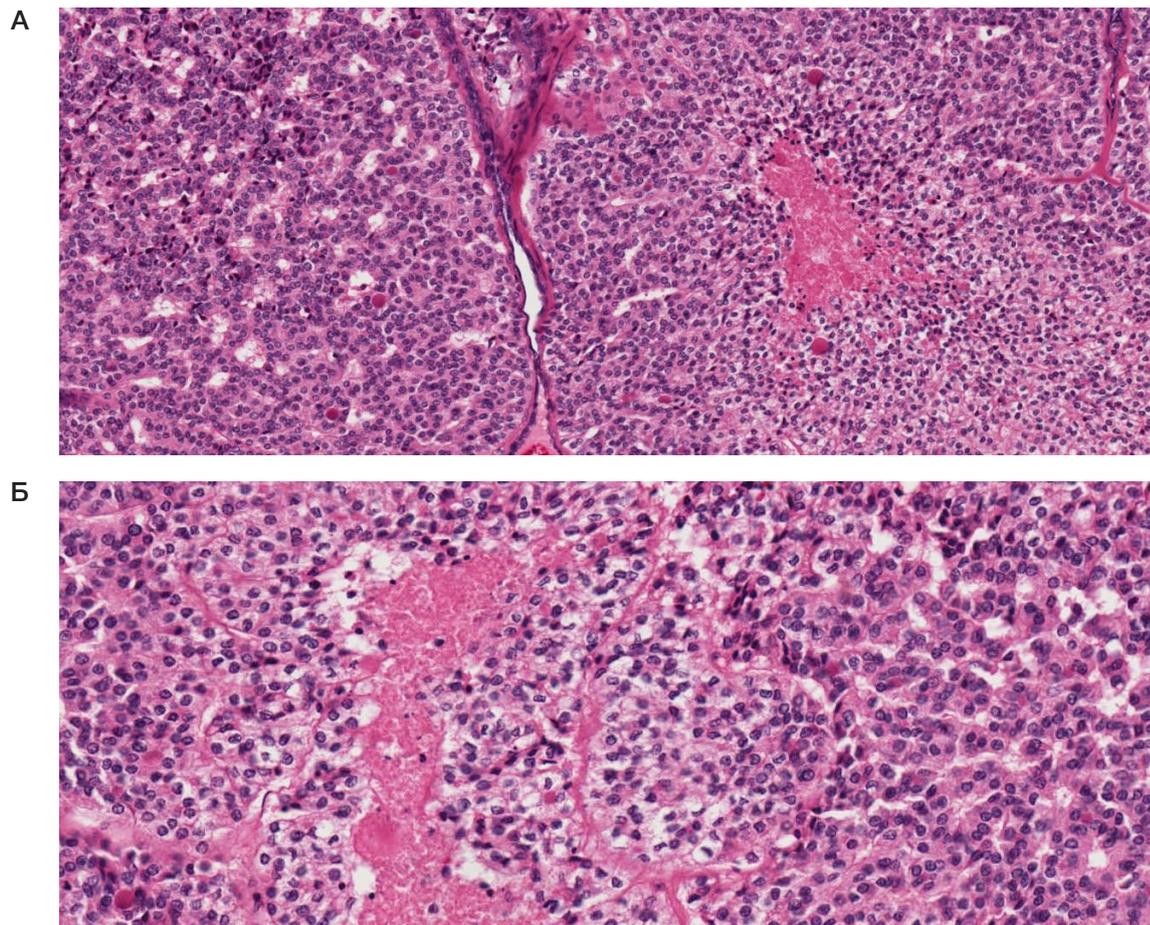


Рис. 3. Дифференцированная высокозлокачественная карцинома щитовидной железы (DHGTC). **А.** Сolidно-трабекулярные и альвеолярные поля с участком «комедо»/географического некроза (H&E, ув. $\times 100$). **Б.** Выраженное нарастание цитологической атипии и пролиферации; частые митозы (≥ 5 на 2 мм^2 при подсчете в полях наибольшей активности) (H&E, ув. $\times 400$)

отражает высокий уровень геномной нестабильности. Отрицательный результат по *BRAF* исключает возможность применения ингибиторов MAPK-каскада, что подчеркивает необходимость поиска иных терапевтических мишеней.

Для клинической практики важно различать PDTC и DHGTC, поскольку критерии их диагностики частично пересекаются. Сравнительный анализ морфологических, иммуногистохимических и молекулярных характеристик представлен в таблице.

С прогностической точки зрения HGFC-NA характеризуются агрессивным течением: пятилетняя выживаемость составляет лишь 40–60% и значительно

снижается при наличии мутаций *TERT* и *TP53*. К основным факторам риска относят высокий уровень Ki-67 ($>20\text{--}30\%$), микро- и макрососудистую инвазию, распространенность процесса на момент диагностики. Раннее выявление этих признаков имеет принципиальное значение для выбора персонализированной терапии, включая таргетные препараты и участие пациентов в клинических исследованиях [13–15].

Практический алгоритм диагностики PDTC и DHGTC может быть представлен следующим образом.

1. Морфологический анализ: выявление архитектонической гетерогенности, некроза и митотической активности.

Таблица. Морфологические, иммуногистохимические и молекулярные характеристики плохо дифференцированной (PDTC) и дифференцированной высокозлокачественной карциномы щитовидной железы (DHGTC)

Критерий	PDTC	DHGTC
Архитектура	Сolidная, трабекулярная, инсулярная	Может быть любой: папиллярная, фолликулярная, solidная и др.
Ядерные признаки папиллярной карциномы	Отсутствуют	Могут присутствовать
Митотическая активность	≥ 3 митоза на 2 мм^2	≥ 5 митозов на 2 мм^2
Некроз	Присутствует (один из критериев диагноза)	Может присутствовать, усиливает диагноз
Критерии Туринского консенсуса (2006)	Необходимы для постановки диагноза	Не применяют
Частота мутаций <i>TERT/TP53</i>	Могут присутствовать, чаще <i>TERT</i>	Часто <i>TERT</i> , <i>TP53</i> , иногда <i>BRAF</i>
Ki-67	Часто $>10\text{--}20\%$	Обычно $>20\%$, нередко $>30\text{--}40\%$
Прогноз	Плохой, но чуть лучше, чем при DHGTC	Плохой, особенно при наличии <i>TERT</i> - и <i>TP53</i> -мутаций
Исключается при наличии	Ядерных признаков папиллярной карциномы	Нет четких исключющих признаков (только количественные критерии)

2. Количественные критерии: число митозов ≥ 3 на 2 мм² указывает на PDTC, число митозов ≥ 5 — на DHGTC.

3. Иммуногистохимический анализ: определение экспрессии Ki-67, p53, TTF-1, PAX8. Высокий индекс Ki-67 (>20–30%) и мутационный тип p53 — признаки высокой злокачественности.

4. Молекулярное тестирование: определение мутаций *TERT*, *TP53*, *BRAF*. Их комбинация определяет прогноз и возможности таргетной терапии.

5. Интеграция данных: окончательная классификация основывается на сочетании морфологии, количественных показателей и молекулярного профиля.

Перспективы таргетной терапии

Выявление мутаций *BRAF V600E* открывает возможность применения ингибиторов MAPK-каскада (dabrafenib, trametinib). При активации PI3K/AKT/mTOR-пути может быть рассмотрено использование соответствующих таргетных средств. Для пациентов с сочетанными мутациями *TERT* и *TP53* перспективным направлением остается участие в клинических исследованиях новых препаратов. Таким образом, молекулярное профилирование HGFC-NA имеет не только прогностическое, но и терапевтическое значение, позволяя подбирать персонализированные стратегии лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Высококвалифицированные неанapластические опухоли щитовидной железы (HGFC-NA) представляют собой редкую и клинически значимую категорию, требующую особого диагностического подхода. Представленный случай дифференцированной высококвалифицированной карциномы (DHGTC) показал типичные признаки этой группы: морфологическую гетерогенность, очаговый некроз, высокую митотическую активность и индекс Ki-67 выше 30%, а также мутационный тип экспрессии p53 при отсутствии изменений *TERT* и *BRAF*. Совокупность морфологических, иммуногистохимических и молекулярных данных позволила подтвердить диагноз и оценить неблагоприятный прогноз. Опыт данного наблюдения подчеркивает необходимость комплексной оценки HGFC-NA с обязательным учетом количественных критериев (митотическая активность, Ki-67), а также статуса *TERT* и *TP53*. Игнорирование этих признаков может привести к недооценке злокачественности и выбору неоптимальной лечебной тактики. В российских условиях представленный случай иллюстрирует важность внедрения молекулярного профилирования в рутинную практику патологической диагностики, что позволит повысить точность верификации, своевременно выявлять агрессивные формы и оптимизировать стратегию ведения пациентов.

Литература

- Rodrigo JP, Coca-Pelaz A, Agaimy A, Franchi A, Woolgar JA, Zafereo M, et al. Poorly differentiated thyroid carcinomas: conceptual controversy and clinical impact. *Virchows Arch.* 2024; 484 (2): 289–304. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-024-03752-5>.
- Cracolici V, Cipriani NA. High-grade non-anaplastic thyroid carcinomas of follicular cell origin: a review of poorly differentiated and high-grade differentiated carcinomas. *Endocr Pathol.* 2023; 34 (1): 29–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-023-09752-6>.
- Resta IT, Montone KT, Livolsi VA. Differentiated high-grade thyroid carcinomas: diagnostic consideration and clinical features. *Hum Pathol.* 2024; 140: 1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2024.01.002>.
- Duong MC, Nguyen LTT, Bhimani N, Thompson EK, Tufano RP, et al. Prognostic significance of key molecular markers in thyroid cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Cancers (Basel).* 2025; 17 (6): 939. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers17060939>.
- Thompson LDR. High-grade differentiated follicular cell-derived thyroid carcinoma versus poorly differentiated thyroid carcinoma: a clinicopathologic analysis of 41 cases. *Endocr Pathol.* 2023; 34 (1): 60–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-023-09770-4>.
- Haq F, Bychkov A, Mete O, Kakudo K, Jung CK, et al. Identification of specific biomarkers for anaplastic thyroid carcinoma through spatial transcriptomic and immunohistochemical profiling. *Endocr Pathol.* 2025; 36 (1): 15–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-025-09858-z>.
- Hernandez-Prera JC, Wenig BM. RAS-mutant follicular thyroid tumors: a continuous challenge for pathologists. *Endocr Pathol.* 2024; 35 (2): 98–110. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-024-09812-5>.
- Chatterjee S, Mair M, Shaha AR, Paleri V, Sawhney R, et al. Current evidences in poorly differentiated thyroid carcinoma: a systematic review and subcategory meta-analysis for clinical decision making. *Endocrine.* 2024; 79 (4): 680–96. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12020-024-03771-x>.
- Yu HW, Jeong SI, Kim W, Choi JY, Ahn CH, et al. Incidence and clinicopathological features of differentiated high-grade thyroid carcinomas: an institutional experience. *Endocr Pathol.* 2023; 34 (2): 210–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-023-09778-w>.
- Nkosi D, Crowe WE, Altman BJ, Oltvai ZN, Nikiforov YE. SATB2 is an emergent biomarker of anaplastic thyroid carcinoma: a series with comprehensive biomarker and molecular studies. *Endocr Pathol.* 2024; 35: 88–101. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-024-09833-0>.
- Scholfield DW, Xu B, Levyn H, Eagan A, Shaha AR, et al. High-grade follicular cell-derived non-anaplastic thyroid carcinoma: correlating extent of invasion and mutation profile with oncologic outcome. *Thyroid.* 2025; 35 (2): 153–65. Available from: <https://doi.org/10.1089/thy.2024.0499>.
- Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Schellens JHM, et al. Dabrafenib plus trametinib in BRAFV600E-mutated rare cancers: the phase 2 ROAR trial. *Nat Med.* 2023; 29 (5): 1103–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02321-8>.
- Hassan FA, Slone C, McDonald RJ, Dueber JC, Jha KK, et al. Folliculin (FLCN) in thyroid tumors: incidence, significance, and role as a driver gene and secondary alteration. *Curr Oncol.* 2025; 32 (4): 224. Available from: <https://doi.org/10.3390/curroncol32040224>.
- Wang Y, Zhang L, Liu Z. Molecular classification of thyroid tumors and key molecular features to identify high-grade thyroid carcinomas. In: Faquin WC, Bongiovanni M, editors. *Thyroid FNA cytology: differential diagnoses and pitfalls.* Singapore: Springer, 2024; p. 239–248. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-99-6782-7_21.
- Tan G, Jin B, Qian X, Li Y, Zhao H, et al. TERT promoter mutations contribute to adverse clinical outcomes and poor prognosis in radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Sci Rep.* 2024; 14: 75087. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75087-9>.

References

- Rodrigo JP, Coca-Pelaz A, Agaimy A, Franchi A, Woolgar JA, Zafereo M, et al. Poorly differentiated thyroid carcinomas: conceptual controversy and clinical impact. *Virchows Arch*. 2024; 484 (2): 289–304. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00428-024-03752-5>.
- Cracolici V, Cipriani NA. High-grade non-anaplastic thyroid carcinomas of follicular cell origin: a review of poorly differentiated and high-grade differentiated carcinomas. *Endocr Pathol*. 2023; 34 (1): 29–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-023-09752-6>.
- Resta IT, Montone KT, Livolsi VA. Differentiated high-grade thyroid carcinomas: diagnostic consideration and clinical features. *Hum Pathol*. 2024; 140: 1–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2024.01.002>.
- Duong MC, Nguyen LTT, Bhimani N, Thompson EK, Tufano RP, et al. Prognostic significance of key molecular markers in thyroid cancer: a systematic literature review and meta-analysis. *Cancers (Basel)*. 2025; 17 (6): 939. Available from: <https://doi.org/10.3390/cancers17060939>.
- Thompson LDR. High-grade differentiated follicular cell-derived thyroid carcinoma versus poorly differentiated thyroid carcinoma: a clinicopathologic analysis of 41 cases. *Endocr Pathol*. 2023; 34 (1): 60–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-023-09770-4>.
- Haq F, Bychkov A, Mete O, Kakudo K, Jung CK, et al. Identification of specific biomarkers for anaplastic thyroid carcinoma through spatial transcriptomic and immunohistochemical profiling. *Endocr Pathol*. 2025; 36 (1): 15–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-025-09858-z>.
- Hernandez-Prera JC, Wenig BM. RAS-mutant follicular thyroid tumors: a continuous challenge for pathologists. *Endocr Pathol*. 2024; 35 (2): 98–110. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-024-09812-5>.
- Chatterjee S, Mair M, Shaha AR, Paleri V, Sawhney R, et al. Current evidences in poorly differentiated thyroid carcinoma: a systematic review and subsection meta-analysis for clinical decision making. *Endocrine*. 2024; 79 (4): 680–96. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12020-024-03771-x>.
- Yu HW, Jeong SI, Kim W, Choi JY, Ahn CH, et al. Incidence and clinicopathological features of differentiated high-grade thyroid carcinomas: an institutional experience. *Endocr Pathol*. 2023; 34 (2): 210–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-023-09778-w>.
- Nkosi D, Crowe WE, Altman BJ, Oltvai ZN, Nikiforov YE. SATB2 is an emergent biomarker of anaplastic thyroid carcinoma: a series with comprehensive biomarker and molecular studies. *Endocr Pathol*. 2024; 35: 88–101. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12022-024-09833-0>.
- Schofield DW, Xu B, Levyn H, Eagan A, Shaha AR, et al. High-grade follicular cell-derived non-anaplastic thyroid carcinoma: correlating extent of invasion and mutation profile with oncologic outcome. *Thyroid*. 2025; 35 (2): 153–65. Available from: <https://doi.org/10.1089/thy.2024.0499>.
- Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Schellens JHM, et al. Dabrafenib plus trametinib in BRAFV600E-mutated rare cancers: the phase 2 ROAR trial. *Nat Med*. 2023; 29 (5): 1103–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02321-8>.
- Hassan FA, Slone C, McDonald RJ, Dueber JC, Jha KK, et al. Folliculin (FLCN) in thyroid tumors: incidence, significance, and role as a driver gene and secondary alteration. *Curr Oncol*. 2025; 32 (4): 224. Available from: <https://doi.org/10.3390/curroncol32040224>.
- Wang Y, Zhang L, Liu Z. Molecular classification of thyroid tumors and key molecular features to identify high-grade thyroid carcinomas. In: Faquin WC, Bongiovanni M, editors. *Thyroid FNA cytology: differential diagnoses and pitfalls*. Singapore: Springer, 2024; p. 239–248. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-99-6782-7_21.
- Tan G, Jin B, Qian X, Li Y, Zhao H, et al. TERT promoter mutations contribute to adverse clinical outcomes and poor prognosis in radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Sci Rep*. 2024; 14: 75087. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75087-9>.

РЕАНИМАЦИЯ РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АУТОАНТИТЕЛ К ИНСУЛИНУ

А. В. Тимофеев¹✉, Р. Р. Галимов¹, Е. А. Колесникова¹, А. С. Артюхов¹, Ю. С. Скоблов², С. В. Тактаров³¹ Российская детская клиническая больница (РДКБ) — филиал Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия³ Российский университет медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Аутоантитела к инсулину (insulin autoantibodies, IAA) — один из главных серологических маркеров сахарного диабета 1-го типа (СД1) — заболевания, обусловленного аутоиммунным разрушением β -клеток в островках поджелудочной железы. Тестирование на IAA используют в ранней и дифференциальной диагностике СД1 и при скрининге на это заболевание. Лучшие зарубежные клинично-диагностические лаборатории (КДЛ) тестируют IAA с помощью разных вариантов радиоиммунологического анализа (РИА). Операционные параметры РИА — диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС) и диагностическая точность (ДТ) — в среднем составляют, соответственно, 44%, 100% и 81%. К сожалению, в России РИА уже давно не применяют для определения IAA. Все российские КДЛ с этой целью используют тест-системы, основанные на иммуноферментном анализе (ИФА). У этих тест-систем ДЧ, ДС и ДТ в среднем составляют, соответственно, 24%, 87% и 62%, т. е. существенно ниже, чем у тест-систем РИА. Целью нашей работы было воспроизвести метод РИА IAA в КДЛ РДКБ. Метод основан на конкурентном связывании IAA с инсулином и меченным ¹²⁵I. Тестировали IAA в образцах сывороток пациентов с впервые выявленным СД1 и пациентов без этого заболевания. ДЧ, ДС и ДТ составили, соответственно, 43%, 100% и 73%. Таким образом, операционные параметры воспроизведенного нами метода РИА IAA приближаются к параметрам методов РИА, применяемых в зарубежных КДЛ, и существенно превосходят параметры метода ИФА.

Ключевые слова: аутоантитела к инсулину, сахарный диабет 1-го типа, радиоиммунологический анализ, диагностическая чувствительность, диагностическая специфичность, диагностическая точность

Вклад авторов: А. В. Тимофеев — идея исследования, анализ результатов, редактирование рукописи; Р. Р. Галимов — подбор и подготовка образцов сывороток, выполнение РИА; Е. А. Колесникова — подготовка текста рукописи; А. С. Артюхов — статистическая обработка результатов РИА; Ю. С. Скоблов — мечение инсулина радиоактивным йодом, измерение радиоактивности проб на счетчике γ -частиц; С. В. Тактаров — подготовка образцов сывороток, выполнение РИА.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (1964 г.) и ее дальнейшими поправками.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Валентинович Тимофеев
Ленинский проспект, д. 117, корп. 2, г. Москва, 119571, Россия; alvaltim@gmail.com

Статья получена: 16.09.2025 **Статья принята к печати:** 16.10.2025 **Опубликована онлайн:** 26.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.049

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/>).

REVIVAL OF RADIOIMMUNOASSAY FOR DETERMINATION OF INSULIN AUTOANTIBODIES

Timofeev AV¹✉, Galimov RR¹, Kolesnikova EA¹, Artyuhov AS¹, Skoblov YuS², Taktarov SV³¹ Russian Children's Clinical Hospital (RCCH) — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia³ Russian University of Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Insulin autoantibodies (IAA) represent the major serological marker of type 1 diabetes mellitus (T1D), the disease resulting from autoimmune damage to β -cells in the pancreatic islets. Testing for IAA is used in early and differential diagnosis of T1D, as well as to perform screening for this disorder. The best foreign diagnostic labs perform IAA tests using different radioimmunoassay (RIA) formats. The RIA performance characteristics, i. e. diagnostic sensitivity (DSe), diagnostic specificity (DSp), and diagnostic accuracy (DA), are on average equal to 44%, 100%, and 81%, respectively. Unfortunately, in Russia RIA has not been used to determine IAA for a long time. All Russian labs use the enzyme-linked immunoassay (ELISA)-based test systems for this purpose. DSe, DSp, and DA of ELISA systems are on average 24%, 87%, and 62%, respectively, i. e. considerably lower compared to RIA systems. Our study aimed to reproduce IAA RIA in the diagnostic lab of the RCCH. The method is based on IAA competitive binding to insulin and ¹²⁵I-labeled insulin. Serum samples from patients with new onset T1D and patients without diabetes were tested for IAA. DSe, DSp, and DA were 43%, 100%, and 73%, respectively. Thus, performance characteristics of the reproduced IAA RIA are close to those of RIAs used in foreign labs and are significantly superior to the characteristics of ELISA-based tests.

Keywords: insulin autoantibodies, type 1 diabetes mellitus, radioimmunoassay, diagnostic sensitivity, diagnostic specificity, diagnostic accuracy

Author contribution: Timofeev AV — study concept, analysis of the results, manuscript editing; Galimov RR — selection and preparation of serum samples, RIA; Kolesnikova EA — manuscript writing; Artyuhov AS — statistical processing of the RIA results; Skoblov YuS — labeling of insulin with radioactive iodine, measuring the sample radioactivity with a gamma counter; Taktarov SV — preparation of serum samples, RIA.

Compliance with ethical standards: the study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (1964) and further amendments.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexei V. Timofeev
Leninsky prospect, 117, korp. 2, Moscow, 119571, Russia; alvaltim@gmail.com

Received: 16.09.2025 **Accepted:** 16.10.2025 **Published online:** 26.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.049

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/>).

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) обусловлен аутоиммунным разрушением β -клеток в островках поджелудочной железы. Разрушение β -клеток ведет к недостатку инсулина и, как следствие, к гипергликемии и другим тяжелым метаболическим нарушениям, поэтому все больные СД1 нуждаются в пожизненной инсулинотерапии. СД1 поражает преимущественно детей и подростков. Существует наследственная предрасположенность к СД1: риск заболеть у ближайших родственников больных примерно в 40 раз выше [1].

Для СД1 характерен латентный доклинический период (ДКП), на протяжении которого происходит постепенная аутоиммунная деструкция β -клеток [2]. ДКП длится от нескольких месяцев до нескольких лет и заканчивается, когда популяция β -клеток сокращается на 70–80%. В этот момент возникают абсолютный дефицит инсулина, гипергликемия и ее симптомы: происходит манифестация СД1 и начинается клинический период болезни. Примерно у половины больных при манифестации развивается острое осложнение СД1 — диабетический кетоацидоз, приводящий к тяжелым нейрокognитивным нарушениям, а иногда и к смерти. Основная причина кетоацидоза — запоздавшее назначение инсулинотерапии.

Представление о том, что СД1 — аутоиммунное заболевание, сложилось к началу 1980-х гг. К этому времени уже было показано, что у большинства пациентов с СД1 в сыворотке присутствуют аутоантитела (аутоАТ), связывающиеся со структурами островковых клеток на криостатных срезах поджелудочной железы [3]. Такие аутоАТ получили название «антитела к островковым клеткам» (islet cell antibodies, ICA). Было понятно, что ICA связываются с некими цитоплазматическими антигенами β -клеток — потенциальными мишенями аутоиммунной реакции. Наиболее вероятным кандидатом в такие антигены казался главный продукт β -клеток — инсулин. Эта гипотеза была подтверждена в 1983 г. группой исследователей из США под руководством Джерри Палмера [4]. С помощью РИА Палмер и коллеги обнаружили IAA у пациентов с впервые выявленным СД1, которым еще не назначили инсулинотерапию, а также у некоторых здоровых родственников больных СД1.

В дальнейшем были открыты аутоАТ и к другим антигенам β -клеток, в частности — к глутаматдекарбоксилазе (glutamic acid decarboxylase antibodies, GADA), тирозинфосфатазе (islet antigen-2 antibodies, IA-2A) и транспортеру цинка 8 (zinc transporter 8 antibodies, ZnT8A) [5]. АутоАТ не играют существенной роли в деструкции β -клеток, но являются ее высокоспецифичными лабораторными маркерами.

Тестирование на аутоАТ применяют для решения следующих задач:

- ранняя диагностика СД1 в ДКП;

- подтверждение диагноза СД1 при нечеткой клинической картине заболевания;

- дифференциальный диагноз между СД1 и другими типами и вариантами СД;

- скрининг на ДКП СД1 в группах риска (например, у ближайших родственников больных) и среди населения.

Последняя задача имеет особое значение по двум причинам. Во-первых, обнаружение маркеров аутоиммунной деструкции β -клеток говорит о высокой вероятности манифестации СД1 и дает возможность пациентам и их родителям к ней подготовиться, а врачам — своевременно назначить инсулинотерапию и предупредить кетоацидоз и его последствия. Во-вторых, скрининг выявляет пациентов, которым показана медикаментозная профилактика СД1 с помощью препаратов, подавляющих аутоиммунную реакцию против β -клеток, например с помощью теплизумаба [6]. Программы скрининга уже много лет проводят в европейских странах, США, Канаде, Австралии, Израиле [7], а в конце 2024 г. такая программа стартовала и в России в НИИЦ эндокринологии [8]. Тесты на аутоАТ являются основным инструментом скрининга, причем важнейшее место среди них занимает тест на IAA, поскольку именно эти аутоАТ появляются уже в начале ДКП и служат самыми ранними индикаторами аутоиммунной реакции против β -клеток [9].

В разных КДЛ для тестирования IAA применяют разные методы. Наиболее распространены РИА, ИПАМЛ (иммунопреципитация антигена, меченного люциферазой); ЭХЛА (электрохемилюминесцентный анализ); ИФА и ИХЛА (иммунохемилюминесцентный анализ). Операционные параметры этих методов — диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС) и диагностическая точность (ДТ) — сильно различаются. Сравнительную оценку операционных параметров разных методов периодически проводят в рамках международной Программы стандартизации тестов на аутоАТ (Islet Autoantibody Standardization Program, IASP) [10]. КДЛ, участвующие в IASP, получают наборы сывороток пациентов с впервые выявленным СД1 и сывороток здоровых доноров крови; каждая КДЛ тестирует IAA во всех сыворотках своим методом. Результаты двух раундов IASP, проведенных в 2018 и 2020 гг., представлены в табл. 1. Как видно, наилучшими ДЧ и ДС и максимальной ДТ обладает метод РИА, второе место по ДТ занимает ИПАМЛ, ИФА находится на четвертом месте, а ИХЛА вообще не имеет ДТ (его AUC < 0,5). Неудовлетворительные операционные параметры ИФА и ИХЛА объясняются тем, что в этих методах антиген (инсулин) сорбируется на твердой фазе — пластике или магнитных частицах, что приводит к нарушению его конформации и экранировке антигенных детерминант.

Таблица 1. Операционные параметры разных тестов на IAA по данным IASP [7]

Метод	ДЧ, %		ДС, %		AUC		ДТ, %		N _{кдл}
	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	Me	IQR	
РИА	44,0	20–56	100,0	99–100	0,811	0,73–0,835	81,1	73–83,5	13
ИПАМЛ	46,0	40–51	98,9	97–99	0,804	0,784–0,842	80,4	78,4–84,2	11
ЭХЛА	53,0	16–58	97,2	92–99	0,774	0,606–0,824	77,4	60,6–82,4	10
ИФА*	24,0	24–30	87,3	83–90	0,624	0,616–0,629	62,4	61,6–62,9	6
ИХЛА	11,0	9–14	66,1	56–76	0,254	0,243–0,265	25,4	24,3–26,5	2

Примечание: AUC — площадь под кривой операционной характеристики теста (area under receiver operating curve); N_{кдл} — число КДЛ-участниц IASP; Me — медиана (median); IQR — межквартильный размах (interquartile range). * — все КДЛ-участницы IASP применяли тест-системы, изготовленные в этих КДЛ (коммерческие тест-системы не использовали).

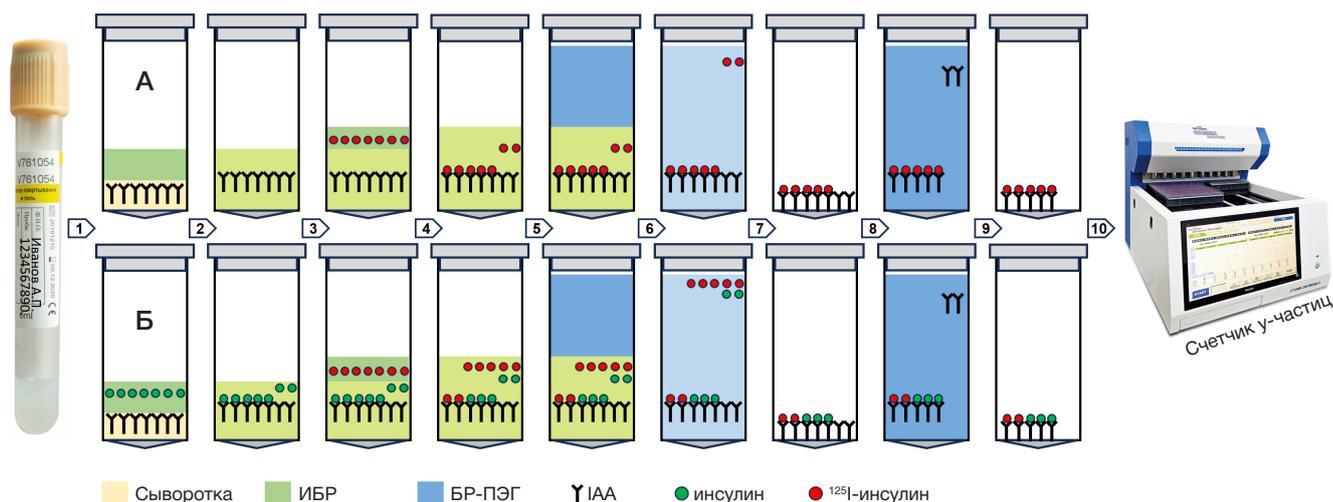


Рис. 1. Процедура РИА IAA. 1. Образцы сывороток (75 мкл) внесли в две серии 1,7-мл конических пробирок Эппендорф (Costar 3207, Corning). В пробирки серии А добавили по 75 мкл 0,23М инкубационного буферного раствора (ИБР) pH 7,4 следующего состава: NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, REF S-0751) 0,014М; Na_2HPO_4 (Panreac, REF 141677) 0,067М; NaCl (Sigma-Aldrich, REF S-9625) 0,15М; бычий сывороточный альбумин (СДН, REF TC1546) 0,05%; Твин-20 (Panreac, REF 162312) 0,05%. В пробирки серии Б добавили по 75 мкл ИБР с рекомбинантным человеческим инсулином (Insulin Reference Standard, Eli Lilly, США) в концентрации 9×10^{-3} ЕД/мл. 2. Пробирки обеих серий встряхивали на вихревом смесителе и инкубировали 30 мин на орбитальном шейкере ELM1-ST3 (Elmi, Латвия) при скорости вращения платформы 250 об./мин при комнатной температуре. За время этой инкубации сывороточные IAA связывались с инсулином. 3. В пробирки обеих серий добавили по 100 мкл ИБР с рекомбинантным человеческим инсулином, меченным ^{125}I (^{125}I -инсулин), в концентрации $7,5 \times 10^{-6}$ ЕД/мл. Кроме того, по 100 мкл ИБР с ^{125}I -инсулином внесли в две пробирки для подсчета общей радиоактивности (РА). Препарат ^{125}I -инсулина был изготовлен в ИБХ путем моноидирования инсулина по тирозину А14 с помощью хлорамина-Т в качестве окислителя, очищен гель-фильтрацией на колонке с Сефадексом G-15. Для йодирования использовали натрия йодид ^{125}I (А/О ИЗОТОП, РФ). В конечном счете получили стабилизированный препарат ^{125}I -инсулина со следующими радиохимическими характеристиками: общая РА — 352 кБк, удельная РА — 58 ТБк/ммоль, радиохимическая чистота — 92%. 4. Все пробирки закрыли крышками и инкубировали 7 сут. в холодильнике при +4 °С. За время инкубации сывороточные IAA связывались с инсулином и ^{125}I -инсулином, и устанавливалось равновесие между связыванием IAA с меченым и немеченым лигандами. 5. Во все пробирки, кроме пробирок для подсчета общей РА, внесли по 500 мкл буферного раствора pH 8,6 с полиэтиленгликолем (БР-ПЭГ) следующего состава: Трис 0,05М (Sigma-Aldrich REF 7-9 Tris base T13,78); ПЭГ-8000 (Polyethylenglycol 8000 BioChemica AppliChem REF A2204.0500) 14%. БР-ПЭГ был предварительно охлажден до 0 °С. 6, 7. Пробирки встряхивали на вихревом смесителе и центрифугировали на центрифуге Бекман G-2-21 при 2000 г 30 мин при +4 °С. Надосадочную жидкость удаляли аспиратором. В результате получили преципитат, содержащий комплексы IAA с меченым и немеченым инсулином, а также IAA, не связавшиеся с инсулином. 8, 9. Во все пробирки, кроме пробирок для подсчета общей РА, внесли по 1000 мкл БР-ПЭГ с 11% ПЭГ-8000, предварительно охлажденного до 0 °С. Пробирки встряхивали на вихревом смесителе и центрифугировали на центрифуге Бекман G-2-21 при 3000 г 30 мин при +4 °С. Надосадочную жидкость удаляли аспиратором. В результате получили преципитат, содержащий комплексы IAA с меченым и немеченым инсулином. 10. Измерили РА во всех пробирках (в том числе в пробирках для подсчета общей РА) на γ -спектрометре Wizard (PerkinElmer, США) при продолжительности измерения 1 мин

К сожалению, в России в настоящее время во всех без исключения КДЛ для тестирования IAA используют коммерческие тест-системы ИФА. Их операционные параметры гораздо хуже, чем у тест-систем, применяемых в КДЛ — участницах IASP. Например, у широко применяемой тест-системы Orgentec Anti-Insulin (Orgentec Diagnostika GmbH, REF ORG520, Германия) ДЧ = 4%, ДС = 95,6%, ДТ = 50%, т. е. эта тест-система не имеет клинической ценности [11]. Недавно на российском рынке появилась система ИХЛА Maglumi IAA (Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd; КНР), но в инструкции по эксплуатации этой системы нет данных о ее операционных параметрах [12].

Таким образом, в нашей стране назрела необходимость создания и внедрения надежных, информативных тест-систем для определения IAA. В связи с этим в КДЛ РДКБ была предпринята попытка воспроизведения классического РИА IAA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общее описание исследования

Тестировали IAA в образцах сывороток пациентов с максимальной и минимальной вероятностью носительства IAA, т. е. пациентов с впервые выявленным СД1 (группа СД1) и пациентов без этого заболевания (группа К, контрольная). Работы проводили в январе–феврале 2024 г. в РДКБ и ИБХ.

Описание групп пациентов

Группа СД1 (n = 21)

М : Ж = 8 : 13 (38% : 62%); возраст 1,1–17,9 года (медиана возраста — 10,1 года, 95%-й доверительный интервал для медианы — 4,2–12,1 года).

Критерии включения пациентов в группу: возраст 0–18 лет, пол любой; диагноз «сахарный диабет 1-го типа, впервые выявленный» (коды МКБ-10 E10.1 или E10.9); длительность СД1 от даты постановки диагноза до даты взятия пробы крови ≤ 3 месяцев; присутствие в сыворотке как минимум двух видов аутоАТ из следующих: ICA, GADA, IA-2A, ZnT8A.

Группа К (n = 19)

М : Ж = 12 : 7 (63% : 37%); возраст 2,5–46,9 года (медиана возраста — 13,3 года, 95%-й доверительный интервал для медианы — 10,2–16,6 года).

Критерии включения пациентов в группу: возраст любой, пол любой; пациент практически здоров (код МКБ-10 Z00) или имеет один из следующих диагнозов: сахарный диабет 2-го типа (МКБ-10 E11), другие уточненные формы СД, в том числе разные формы моногенного СД (МКБ-10 E13, E13.9), ожирение (МКБ-10 E66), СД неуточненный (МКБ-10 E14, E14.9), синдром Иценко–Кушинга (МКБ-10 E24), болезнь Иценко–Кушинга гипофизарного происхождения (МКБ-10 E24.0), синдром Тернера (МКБ-10 Q96); пациенту никогда не ставили диагноз СД1; пациент никогда не получал инъекции инсулина; в сыворотке пациента отсутствуют ICA, GADA, IA-2A, ZnT8A.

Таблица 2. Результаты измерения C_{IAA} в образцах сывороток

Группа СД1				Группа К					
№	Пациент			C_{IAA} , нЕД/мл	№	Пациент			C_{IAA} , нЕД/мл
	Пол	Возраст	Диагноз (МКБ-10)			Пол	Возраст	Диагноз (МКБ-10)	
1	м	7,9	ВВСД1 (E10.1)	29	22	м	42,0	Здоров (Z00)	6
2	ж	14,0	ВВСД1 (E10.1)	11	23	м	46,9	МГД MODY2 (E13)	37
3	м	10,1	ВВСД1 (E10.9)	102	24	м	40,9	СД2 (E11)	15
4	м	4,0	ВВСД1 (E10.1)	17	25	м	15,5	СД2 (E11)	6
5	ж	12,3	ВВСД1 (E10.9)	471	26	м	7,6	Здоров (Z00)	24
6	ж	3,0	ВВСД1 (E10.1)	20	27	ж	7,0	Здоров (Z00)	10
7	ж	5,2	ВВСД1 (E10.1)	24	28	ж	10,6	СД2 (E11)	172
8	м	13,7	ВВСД1 (E10.9)	164	29	ж	27,7	СДНУ (E14)	24
9	ж	12,2	ВВСД1 (E10.9)	17	30	м	15,4	Здоров (Z00)	29
10	ж	4,1	ВВСД1 (E10.9)	193	31	ж	15,1	СД2 (E11, E66)	33
11	м	11,0	ВВСД1 (E10.1)	58	32	м	11,8	Здоров (Z00)	12
12	м	13,8	ВВСД1 (E10.9)	25	33	м	16,8	СДНУ (E14)	15
13	м	12,0	ВВСД1 (E10.9)	1	34	м	2,5	СДстер (E13.9)	17
14	ж	11,3	ВВСД1 (E10.9)	19	35	ж	16,5	СД2 (E11, Q96.3)	22
15	ж	3,4	ВВСД1 (E10.1)	16	36	ж	13,3	Ожирение (E66)	9
16	ж	11,7	ВВСД1 (E10.9)	41	37	м	2,8	СДстер (E13.9)	20
17	ж	8,0	ВВСД1 (E10.1)	21	38	м	10,6	СДстер (E13.9)	45
18	м	2,6	ВВСД1 (E10.9)	256	39	м	8,8	Здоров (Z00)	14
19	ж	17,9	ВВСД1 (E10.9)	1047	40	ж	12,8	СД2 (E11, E24.0)	31
20	ж	4,2	ВВСД1 (E10.9)	83					
21	ж	1,1	ВВСД1 (E10.9)	73					

Примечание: № — порядковый номер образца сыворотки; ВВСД1 — сахарный диабет 1-го типа, впервые выявленный; МГД MODY2 — моногенный сахарный диабет, вариант MODY2 (мутация в гене гексокиназы); СД2 — сахарный диабет 2-го типа; СДНУ — сахарный диабет неуточненный; СДстер — сахарный диабет, вызванный приемом глюкокортикостероидов. Красным цветом помечен результат, квалифицированный как статистический выброс.

Метод тестирования на IAA

Воспроизведен метод конкурентного РИА (competitive radioimmunoassay) Дж. Палмера и соавторов [4]. Процедура РИА детально представлена на рис. 1.

Метод расчета концентрации IAA

Метод включал следующие этапы:

– рассчитывали среднюю общую РА ($PA_{общ}$, число импульсов за минуту) в двух пробирках для подсчета общей РА. $PA_{общ}$ равнялась 5000 срт;

– для каждого образца сыворотки регистрировали РА (число импульсов за минуту) в пробирке без добавления немеченого инсулина (PA_A) и в пробирке с добавлением немеченого инсулина (PA_B);

– для каждого образца сыворотки рассчитывали процент связывания ^{125}I -инсулина (ПС) в пробирке без добавления немеченого инсулина ($ПС_A$) и в пробирке с добавлением немеченого инсулина ($ПС_B$) по формулам:

$$ПС_A = PA_A : PA_{общ} \text{ и } ПС_B = PA_B : PA_{общ};$$

– для каждого образца сыворотки рассчитывали разность процентов связываний (Д, дельта) по формуле: $Д = ПС_A - ПС_B$;

– для каждого образца сыворотки рассчитывали концентрацию IAA (C_{IAA}) по формуле:

$$C_{IAA} = (Д \times 10\,000) : 100 \text{ (нЕд/мл)}.$$

Методы статистической обработки результатов и расчета операционных параметров теста

Для выявления статистических выбросов в группах СД1 и К применяли, соответственно, левосторонний и правосторонний критерии Граббса, для построения кривой операционной характеристики теста — метод DeLong et al. [13], при этом распространенность СД1 считали равной 0,123% [14]. ДЧ, ДС и ДТ рассчитывали по AUC. Для всех расчетов использовали медико-статистическую программу MedCalc [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты измерения C_{IAA} представлены в табл. 2.

Один результат (для образца сыворотки № 28) был квалифицирован как выброс. Таким образом, в статистический анализ были включены результаты измерений C_{IAA} в 21 образце сыворотки группы СД1 и в 18 образцах сывороток группы К. В группе СД1 значения C_{IAA} варьировали от 1 до 1047 нЕД/мл, в группе К — от 6 до 45 нЕД/мл. При построении кривой операционной характеристики теста программа MedCalc автоматически выбрала в качестве критерия позитивности теста (наличия IAA в образце сыворотки) значение C_{IAA} , превышающее 45 нЕД/мл. ДЧ, ДС и ДТ теста, рассчитанные по AUC с применением указанного критерия, составили, 42,9%, 100% и 72,8% с 95%-ми доверительными интервалами 21,8–66%, 81,5–100% и 56,1–85,7% соответственно (рис. 2).

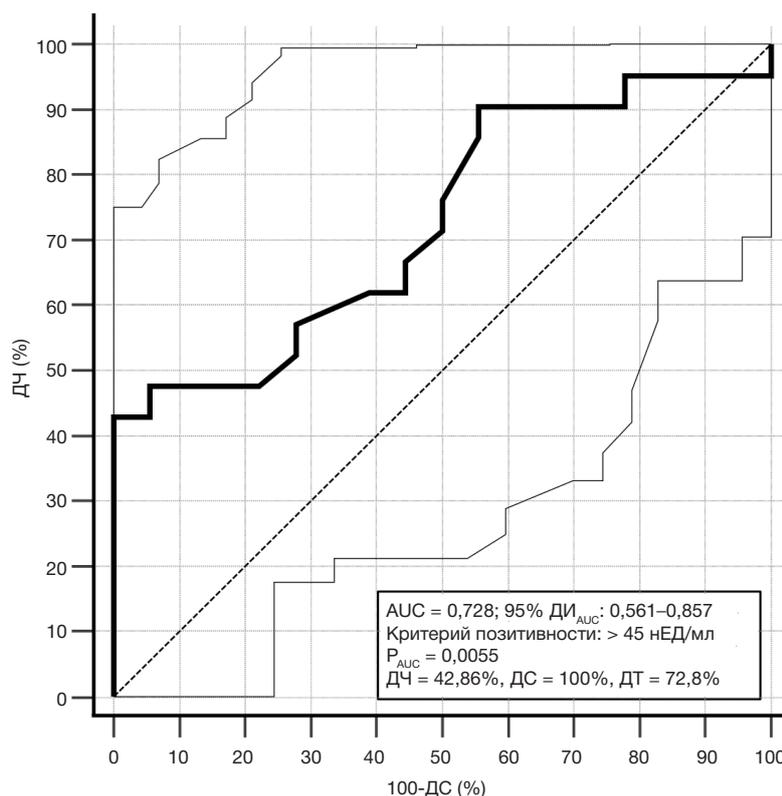


Рис. 2. Кривая операционной характеристики (Receiver Operator Curve) теста на IAA. Пунктирная кривая — линия, ограничивающая AUC, равную 0,5. Сплошная кривая с маркерами — кривая операционной характеристики теста. Точечные кривые — границы 95%-го доверительного интервала (95%ДИ_{AUC}) для кривой операционной характеристики. P_{AUC} — вероятность достоверности нулевой гипотезы об отсутствии различия между AUC 0,5 и AUC теста

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным IASP, для разных методов РИА IAA медианы ДЧ, ДС и ДТ составляют 44%, 100% и 81,1 соответственно (табл. 1). У нашего метода ДЧ (42,9%) весьма близка к медиане ДЧ РИА IASP, а ДС совпадает с медианой ДС IASP. Однако ДТ нашего метода (72,8%) оказалась существенно ниже медианы ДТ РИА IASP и не попала в ее интерквартильный интервал. Мы объясняем расхождение результата нашего метода РИА с результатами РИА в других КДЛ-участниках IASP (более низкую ДТ нашего метода) двумя причинами:

- очень маленькая численность обеих групп;
- в состав инкубационного буферного раствора (ИБР), применявшегося Дж. Палмером и соавторами [4], входил бычий γ -глобулин в концентрации 0,025%, блокирующий неспецифическое связывание инсулина с «не-IAA» иммуноглобулинами в образцах сывороток. В нашем ИБР этот реагент отсутствовал.

Необходимо отметить, что операционные параметры нашего метода тестирования на IAA оказались лучше, чем у методов ИФА и ИХЛА, представленных в IASP, и намного

превышали операционные параметры упоминавшейся выше ИФА-тест-системы Orgentec Anti-Insulin, популярной в российских КДЛ.

ВЫВОДЫ

В конечном счете мы расцениваем наши результаты как успешные, поскольку операционные параметры предлагаемого метода оказались гораздо лучше, чем у методов ИФА и ИХЛА. Мы считаем, что после соответствующей доводки наш метод РИА IAA можно применять как с научными целями, так и в клинической практике. К сожалению, на сегодня применение этого метода в КДЛ РДКБ невозможно по двум причинам: отсутствие счетчика γ -частиц; отсутствие помещений для работ с радионуклидами, лицензированных Роспотребнадзором и Росздравнадзором. Однако мы надеемся, что со временем в РДКБ — филиале Пироговского Университета — удастся наладить РИА IAA, в котором так нуждаются российская диабетологическая наука и практика.

Литература

1. Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes. *Immunity*. 2010; 32 (4): 468–78. PubMed PMID: 20412757. DOI:10.1016/j.immuni.2010.03.018.
2. Общественная организация Российская ассоциация эндокринологов. Сахарный диабет 1 типа у детей. Клинические рекомендации. 2025. Доступно по ссылке: https://edu.endocrincentr.ru/sites/default/files/recommendation_pdf/kr287_3.pdf. Дата обращения 08.10.2025.
3. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 1974; 7892 (2): 1279–83. PubMed PMID: 29061712. DOI: 10.1016/S0140-6736(74)90140-8.
4. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 1983; 222 (4630): 1337–9. PubMed PMID: 6362005. DOI: 10.1126/science.6362005.

5. Kawasaki E. Anti-Islet Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (12): 10012. PubMed PMID 37373160. DOI: 10.3390/ijms241210012.
6. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, et al. An anti-CD3 antibody, teplizumab, in relatives at risk for type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2019; 381 (7): 603–13. PubMed PMID: 31180194. DOI: 10.1056/NEJMoa1902226.
7. Phillip M, Achenbach P, Addala A, Albanese-O'Neill A, Battelino T, et al. Consensus guidance for monitoring individuals with islet autoantibody-positive pre-stage 3 type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2024; 67 (9): 1731–59. PubMed PMID: 38910151. DOI: 10.1007/s00125-024-06205-5.
8. ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова». Приглашение к участию в исследовании по скринингу сахарного диабета 1 типа. Доступно по ссылке: https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/all/issledovanie_po_skriningu_saharnogo_diabeta_1_tipa/priglasenie_dlya_uchastiya_v_skrininge.pdf?language=en. Дата обращения 08.10.2025.
9. Yu L, Rewers M, Gianani R, Kawasaki E, Zhang Y, Verge C et al. Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81 (12): 4264–7. PubMed PMID: 8954025. DOI: 10.1210/jcem.81.12.8954025.
10. Marzinotto I, Pittman DL, Williams AJK, Long AE, Achenbach P, Schlosser M, et al. Islet Autoantibody Standardization Program: interlaboratory comparison of insulin autoantibody assay performance in 2018 and 2020 workshops. *Diabetologia.* 2024; 66 (5): 897–912. PubMed PMID: 36759247. DOI: 10.1007/s00125-023-05877-9.
11. Тимофеев А. В., Горст К. А., Уваров В. Ю., Пронина Е. А., Витебская А. В., Попович А. В. и др. Диагностическая ценность применяющихся в России методов исследования антител к антигенам β-клеток. Классический иммунофлуоресцентный метод определения антител к островковым клеткам, радиоиммунный метод определения антител к глутаматдекарбоксилазе и иммуноферментные методы определения антител к тирозинфосфатазе и инсулину. *Сахарный диабет.* 2016; 19 (4): 331–40. DOI: /10.14341/DM8032.
12. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. MAGLUMI IAA (CLIA) Instruction for Use. Available from: <https://hoachatxetnghiem.com.vn/en/downloads/snibe-maglumi-iaa-clia.pdf>. (Last accession 07.10.2025.)
13. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988; 44 (3): 837–45. PubMed PMID 3203132.
14. Дедов И. И., Шестакова М. В., Викулова О. К., Железнякова А. В., Исаков М. А., Сазонова Д. В. и др. Сахарный диабет в Российской Федерации: динамика эпидемиологических показателей по данным Федерального регистра сахарного диабета за период 2010–2022 гг. *Сахарный диабет.* 2023; 26 (2): 104–23. DOI: 10.14341/DM13035.
15. MedCalc® Statistical Software version 23.3.7 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2025).

References

1. Ziegler AG, Nepom GT. Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes. *Immunity.* 2010; 32 (4): 468–78. PubMed PMID: 20412757. DOI:10.1016/j.immuni.2010.03.018.
2. Obshchestvennaya organizaciya Rossijskaya associaciya endokrinologov. Saharnyj diabet 1 tipa u detej. Klinicheskie rekomendacii. 2025. Dostupno po ssylke: https://edu.endocrincentr.ru/sites/default/files/recommendation_pdf/kr287_3.pdf. Data obrashcheniya 08.10.2025. Russian.
3. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 1974; 7892 (2): 1279–83. PubMed PMID: 29061712. DOI: 10.1016/S0140-6736(74)90140-8.
4. Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science.* 1983; 222 (4630): 1337–9. PubMed PMID: 6362005. DOI: 10.1126/science.6362005.
5. Kawasaki E. Anti-Islet Autoantibodies in Type 1 Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (12): 10012. PubMed PMID 37373160. DOI: 10.3390/ijms241210012.
6. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, et al. An anti-CD3 antibody, teplizumab, in relatives at risk for type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2019; 381 (7): 603–13. PubMed PMID: 31180194. DOI: 10.1056/NEJMoa1902226.
7. Phillip M, Achenbach P, Addala A, Albanese-O'Neill A, Battelino T, et al. Consensus guidance for monitoring individuals with islet autoantibody-positive pre-stage 3 type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2024; 67 (9): 1731–59. PubMed PMID: 38910151. DOI: 10.1007/s00125-024-06205-5.
8. GNC RF FGBU «NMIЦ эндокринологии им. академика И.И. Дедова». Priglasenie k uchastiyu v issledovanii po skriningu saharnogo diabeta 1 tipa. Dostupno po ssylke: https://www.endocrincentr.ru/sites/default/files/all/issledovanie_po_skriningu_saharnogo_diabeta_1_tipa/priglasenie_dlya_uchastiya_v_skrininge.pdf?language=en. (Data obrashcheniya 08.10.2025.) Russian.
9. Yu L, Rewers M, Gianani R, Kawasaki E, Zhang Y, Verge C et al. Antiislet autoantibodies usually develop sequentially rather than simultaneously. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81 (12): 4264–7. PubMed PMID: 8954025. DOI: 10.1210/jcem.81.12.8954025.
10. Marzinotto I, Pittman DL, Williams AJK, Long AE, Achenbach P, Schlosser M, et al. Islet Autoantibody Standardization Program: interlaboratory comparison of insulin autoantibody assay performance in 2018 and 2020 workshops. *Diabetologia.* 2024; 66 (5): 897–912. PubMed PMID: 36759247. DOI: 10.1007/s00125-023-05877-9.
11. Timofeev AV, Gorst KA, Uvarov VYu, Pronina EA, Vitebskaya AV, Popovich AV, i dr. Diagnosticheskaya cennost' primenyayushchihysya v Rossii metodov issledovaniya antitel k antigenam β-kletok. Klassicheskij immunofluorescentnyj metod opredeleniya antitel k ostrovkovym kletkam, radioimmunnyj metod opredeleniya antitel k glutamatdekarboksilaze i immunofermentnye metody opredeleniya antitel k tirozinfosfataze i insulinu. *Saharnyj diabet.* 2016; 19 (4): 331–40. DOI: /10.14341/DM8032. Russian.
12. Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. MAGLUMI IAA (CLIA) Instruction for Use. Available from: <https://hoachatxetnghiem.com.vn/en/downloads/snibe-maglumi-iaa-clia.pdf>. (Last accession 07.10.2025.)
13. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988; 44 (3): 837–45. PubMed PMID 3203132.
14. Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA, Sazonova DV, i dr. Saharnyj diabet v Rossijskoj Federacii: dinamika epidemiologicheskikh pokazatelej po dannym Federal'nogo registra saharnogo diabeta za period 2010–2022 gg. *Saharnyj diabet.* 2023; 26 (2): 104–23. DOI: 10.14341/DM13035. Russian.
15. MedCalc® Statistical Software version 23.3.7 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2025).

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОИСКА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ ОБОСНОВАННОЙ ТЕРАПИИ ЭПИЛЕПСИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ГЛИОМОЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Т. И. Ашхацава¹, В. А. Калинин²✉, А. В. Якунина², И. Е. Повереннова²

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий, Москва, Россия

² Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

В последние десятилетия научные исследования глиальных опухолей головного мозга в большей степени сосредоточены на изучении биохимических и молекулярных механизмов как в самой опухолевой, так и в перитуморальной ткани, что открывает новые и беспрецедентные перспективы в понимании патогенеза и терапии эпилепсии, ассоциированной с глиомами. Данные свидетельствуют о том, что нейроны играют центральную роль в росте опухоли и, в свою очередь, раковые клетки могут изменять конфигурацию нервной системы и ее функций. В ткани, окружающей глиому, выявляются уровни внеклеточного глутамата до 100 раз выше, чем в здоровом мозге. В то же время существующие данные подтверждают концепцию о том, что возбуждающий нейромедиатор глутамат является важнейшим медиатором припадков, связанных с глиомой. В статье описаны некоторые аспекты патогенеза глиомы головного мозга. По мнению авторов, современные противоэпилептические препараты могут влиять на течение опухолевого процесса. Представлен ряд противоэпилептических препаратов, имеющих противоопухолевый потенциал.

Ключевые слова: опухоль-ассоциированная эпилепсия, глиома, первичные опухоли головного мозга, нейроонкология, противоэпилептические препараты

Вклад авторов: Т. И. Ашхацава — сбор материала, систематизация данных; В. А. Калинин, А. В. Якунина — анализ данных, написание статьи; И. Е. Повереннова — редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Анатольевич Калинин
ул. Чапаевская, д. 89, г. Самара, 89443099, Россия; v.a.kalinin@samsmu.ru

Статья получена: 18.09.2025 **Статья принята к печати:** 06.10.2025 **Опубликована онлайн:** 27.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.051

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/>).

PROSPECTS OF FINDING PATHOLOGICALLY BASED THERAPIES FOR EPILEPSY ASSOCIATED WITH BRAIN GLIOMA

Ashkhatsava TI¹, Kalinin VA²✉, Yakunina AV², Poverennova IE²

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Samara State Medical University, Samara, Russia

In recent decades, scientific research on tumor-associated epilepsy has increasingly focused on the study of the biochemical and molecular mechanisms of the brain tumor and peritumoral tissues, opening up new and unprecedented perspectives in understanding the glioma-associated epilepsy pathogenesis and treatment. Evidence suggests that neurons play a central role in tumor growth and cancer cells, in turn, can reconfigure the nervous system and its functions. Extracellular glutamate levels in the tissue around the glioma are up to 100 times higher than those in the healthy brain, as detected. At the same time, the available data support the idea that the excitatory neurotransmitter glutamate is the most significant mediator of the seizures related to glioma. The article reports some aspects of the cerebral glioma pathogenesis. The authors believe that modern antiepileptic drugs can affect the neoplastic process course. A number of antiepileptic drugs having the antitumor potential are presented.

Keywords: tumor-associated epilepsy, glioma, primary brain tumors, neurooncology, antiepileptic drugs

Author contribution: Ashkhatsava TI — data collection and systematization; Kalinin VA, Yakunina AV — data analysis, manuscript writing; Poverennova IE — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir A. Kalinin
Chapaevskaya, 89, Samara, 89443099, Russia; v.a.kalinin@samsmu.ru

Received: 18.09.2025 **Accepted:** 06.10.2025 **Published online:** 27.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.051

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/>).

Эпилепсия, ассоциированная с опухолями головного мозга, в соответствии с Международной классификацией эпилепсии и эпилептических синдромов (ILAE, 2017) относится к структурной фокальной эпилепсии и диагностируется в 10–15% случаев дебюта эпилепсии. Еще в 1947 г. в пятом издании «Болезней нервной системы» Д. Вильсон отметил, что генерализованные припадки могут быть первым симптомом внутрочерепной опухоли, отметив факт более позднего дебюта опухоль-ассоциированной эпилепсии в отличие от идиопатической эпилепсии. К. Льюкеном и его коллегами из Боннского университета в 2003 г. предложено назвать эту группу «опухольями,

ассоциированными с длительно присутствующей фармакорезистентной эпилепсией» — long-term epilepsy associated tumors (LEAT) [1]. Они представлены глионейрональными опухолями и некоторыми астроцитомами, чаще низкой степени злокачественности.

Наиболее распространенными опухолями центральной нервной системы являются глиобластомы (глиомы IV степени злокачественности по классификации ВОЗ). Средний возраст дебюта заболевания — 64 года, общая пятилетняя выживаемость составляет 6,8% — один из худших прогнозов во всем онкологическом спектре. При глиомах низкой степени злокачественности 70–90%

пациентов страдают эпилептическими припадками на момент выявления опухоли, тогда как при глиобластоме приступы встречаются реже (до 60%) [2].

Патогенетические процессы, лежащие в основе развития глиом и опухоль-ассоциированной эпилепсии

По последним данным, нейроны играют центральную роль в росте опухоли, а патологические клетки в свою очередь могут изменять конфигурацию нервной системы и ее функции. Имеются свидетельства формирования функциональных синапсов между нейронами и клетками глиомы [3].

Эпилептогенез в перитуморальной ткани — многофакторный процесс. Развитие глиобластомы и опухоль-ассоциированная эпилепсия имеют общие патофизиологические механизмы, которые приводят как к прогрессированию опухоли, так и к персистенции эпилептических припадков. Одним из основных патологических механизмов является аберрантная передача сигналов глутамата в опухолевой ткани и ее микроокружении. Было обнаружено, что в окружающей глиому ткани уровни внеклеточного глутамата в 100 раз выше, чем в здоровом мозге. С одной стороны, высокий уровень глутамата стимулирует пролиферацию и инвазию клеток глиомы, а с другой стороны, может привести к эпилептическим припадкам, эксайтотоксичности и, следовательно, способствовать объемному увеличению площади опухоли [4].

В последнее десятилетие важную роль в различных аспектах опухолевого процесса отводят цистин/глутаматному антипортеру (SLC7A11, или xCT), который является основным переносчиком цистина внутрь клетки в обмен на глутамат с последующим синтезом глутатиона, необходимого для защиты клеток от окислительного стресса [5].

Другим механизмом увеличения количества глутамата является экспрессия гена *BCAT1*, который кодирует цитозольную форму фермента трансаминазы аминокислот с разветвленной цепью. Уровень экспрессии *BCAT1* — важный прогностический фактор для пациентов с глиомой, который сопряжен со злокачественным прогрессированием глиом с IDH1 дикого типа [6]. Таким образом, *BCAT1* является многообещающей мишенью для лечения первичной глиобластомы и глиом.

Имеются данные, что увеличение количества глутамата в перитуморальной ткани представляет собой фактор риска развития некроза опухоли, являющегося важным прогностическим фактором неблагоприятного исхода для пациентов. Возбуждающее действие глутамата реализуется через активацию трех основных типов ионотропных рецепторов и нескольких классов метаболитных рецепторов, связанных с G-белками. Ионотропные рецепторы представлены рецепторами N-метил-D-аспарагиновой кислоты (NMDA), α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA), каиновой кислоты (KA) [7]. Проницаемость AMPA-рецепторов для Ca^{2+} определяется наличием или отсутствием субъединицы GluR2 в рецепторном комплексе.

Анализ лекарственной устойчивости глиобластом позволил выявить также эпигенетические модификации, в частности метилирование ДНК, определяющее прогрессирование опухоли. В этом процессе значимая роль принадлежит некодирующему классу

РНК — микроРНК. Выявлены микроРНК, обладающие проонкогенным и защитным действием, а также эпигенетическая модификация микроРНК, которая посредством метилирования может изменять экспрессию при глиобластоме. Уточнение формы эпилепсии посредством исследования специфических микроРНК в плазме крови, особенно в клинически сложных случаях, позволит подобрать максимально эффективную противоэпилептическую терапию [8].

Таким образом, очевидно, что существуют единые механизмы патогенеза перитуморальных изменений и генерации эпилептических припадков, причем описанные процессы приобретают каскадный характер, взаимно усиливая и ускоряя друг друга. Возможность разорвать или затормозить патологические процессы позволит решить проблему не только возникновения эпилептических приступов, но и контроля опухолевого роста.

Поиск противоэпилептических препаратов с потенциальным противоопухолевым действием

В настоящее время можно говорить о том, что препараты, влияющие на механизмы генерации эпилептического припадков, с высокой долей вероятности влияют на опухолевую агрессию. Своевременно назначенная терапия ПЭП позволяет увеличить сроки «выживаемости» пациентов с глиобластомами. В связи с гипотезой о том, что высвобождаемый из клеток глиомы глутамат может не только активировать окружающие нейроны, вызывая эпилептические приступы и процессы эксайтотоксичности, но и способствовать прогрессированию глиомы, для лечения пациентов с парциальными и генерализованными припадками должны быть использованы ПЭП с антиглутаматным механизмом действия [9].

Использование препарата перампанел при эпилепсии у пациентов с IDH1-диким типом и MGMT-неметилированной глиобластомой позволило избавиться от припадков и способствовало выживанию в течение 18 месяцев [10].

Глубокое и всестороннее рассмотрение различных аспектов эпилептогенеза при глиобластоме головного мозга дает обоснование для выбора медикаментозной терапии. Несмотря на то что конкретных рекомендаций по выбору противосудорожного препарата при опухоли-ассоциированной эпилепсии не разработано, существует постоянный интерес к выявлению соединений с противоопухолевым эффектом *in vitro*. Многочисленные доклинические исследования показали, что леветирацетам может усиливать ответ глиобластомы на темозоломид [11]. Бриварацетам, имея схожую по строению с леветирацетамом молекулу, должен обладать таким же механизмом действия. Используя бриварацетам, мы можем рассчитывать на получение эффекта более выраженного, поскольку переносимость препарата лучше леветирацетама.

Перспективными для лечения опухоли-ассоциированной эпилепсии с нашей точки зрения являются новейшие ПЭП бриварацетам и лакосамид. Авторы предположили, что последние два снижают высвобождение глутамата не только из нейронов, но и из астроглии [12]. Лакосамид оказывает ингибирующее действие на деацетилазу гистонов, на основании чего можно предположить его противоопухолевый эффект, требующий дополнительного изучения. Действительно, этот механизм был предложен для объяснения блокады клеточного цикла в клетках глиомы, возможно, путем активации микроРНК miR-195-5p. Эта же группа исследователей предположила, что,

модулируя другие модификации микроРНК (miR-107), лакосамид способен ингибировать рост клеток, усиливать апоптоз и блокировать их миграцию и инвазию. Большое преимущество лакосамиду дает наличие формы для парентерального введения в эквивалентных дозах.

В настоящее время одной из наиболее перспективных комбинаций ПЭП в отношении эпилепсии, ассоциированной с глиомами головного мозга, может быть комбинация леветирацетама и лакосамида. Подобная комбинация позволяет эффективно контролировать эпилептические припадки и сочетается с адьювантной радиохимиотерапией, что сохраняет низкий уровень нежелательных явлений терапии основного заболевания. Тем не менее, обнадеживающие результаты исследований *in vitro* влияния леветирацетама и лакосамида на глиобластому в исследованиях *in vivo* показали неоднозначные результаты по выживаемости пациентов [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературы показывает, что проблема патогенеза опухоли-ассоциированной эпилепсии рассматривается достаточно широко. Современные представления основываются и на биохимических нарушениях в перитуморозной зоне как результате бластоматозного роста, и на эффекте киндлинга, связанного с нарушением нейронной миграции [14]. В то же время целый ряд конкретных вопросов, связанных с диагностикой и терапией заболевания, остается недостаточно изученным. Диагностические проблемы ранней диагностики первичных опухолей головного мозга сохраняют свою актуальность. В первую очередь речь должна идти о клинической диагностике, изучении семиологии приступа, что позволяет сформулировать показания и алгоритм использования нейровизуализационных методик, изучении гистологии и степени анаплазии опухоли. В настоящее время алгоритмы нейровизуализации усложняются параллельно с развитием

технологий [15]. Не существует единой тактики выбора ПЭП при опухоли-ассоциированной эпилепсии. Между тем, уточнение механизмов эпилептогенеза является предпосылкой как для разработки терапевтически эффективных ПЭП, так и для совершенствования стратегий комплексного лечения опухоли-ассоциированной эпилепсии. Чрезмерная активность глутамата и его рецепторов способствует как росту самой глиомы, так и апоптозу и эпилептической активности перитуморальной области. Очаги эпилептической активности и глиома могут оказывать взаимное влияние друг на друга. Вероятно, существует патологический замкнутый круг, в котором рост опухоли провоцирует эпилептические приступы, а избыточная нейронная активность может стимулировать прогрессирование опухоли. Сочетание противосудорожных препаратов с различным механизмом действия позволит улучшить прогноз и качество жизни пациентов с эпилепсией, ассоциированной с опухолями головного мозга [16]. Перампанел, действующий как селективный неконкурентный антагонист AMPA, может быть одним из препаратов выбора для дополнительной терапии эпилептических приступов, ассоциированных с опухолями головного мозга [16]. Другие «новейшие» ПЭП, такие как лакосамид, бриварацетам, в патогенетически обоснованных комбинациях могут, вероятно, влиять как на качество жизни пациентов, так и на их выживаемость. Следует избегать использования ПЭП, индуцирующих микросомные ферменты печени системы P450. Препараты с таким механизмом действия могут снижать эффективность химиотерапии. Кроме того, использование ингибиторов системы P450 может увеличить риски нежелательных явлений химиотерапевтических препаратов. Уточнение механизмов эпилептогенеза является предпосылкой как для разработки терапевтически эффективных антиконвульсантов, так и для совершенствования стратегий комплексного лечения опухолей, ассоциированных с эпилепсией.

Литература

1. SLuyken C, Blümcke I, Fimmers R, Urbach H, Elger C, Wiestler O, et al. 2003. The spectrum of long-term epilepsy-associated tumors: long-term seizure and tumor outcome and neurosurgical aspects. *Epilepsia*. 2003; 44: 822–30.
2. Lange F, Hornschemeyer J, Kirschstein T. Glutamatergic Mechanisms in Glioblastoma and Tumor-Associated Epilepsy. *Cells*. 2021; 10 (5): 1226. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10051226>.
3. Venkataramani V, Tanev DI, Strahle C, et al. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature*. 2019; 573 (7775): 532–38. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1564-x>.
4. Yuen TI, Morokoff AP, Bjorksten A, et al. Glutamate is associated with a higher risk of seizures in patients with gliomas. *Neurology*. 2012; 79 (9): 883–9. Available from: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318266fa89>.
5. Lo M, Wang YZ, Gout PW. The x(c)-cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol*. 2008; 215 (3): 593–602. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.21366>.
6. Yi L, Fan X, Li J, et al. Enrichment of branched chain amino acid transaminase 1 correlates with multiple biological processes and contributes to poor survival of IDH1 wild-type gliomas. *Aging (Albany NY)*. 2021; 13 (3): 3645–60. Available from: <https://doi.org/10.18632/aging.202328>.
7. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010; 62 (3): 405–96. Available from: <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>.
8. Timechko EE, Lysova KD, Yakimov AM, Paramonova AI, Vasilieva AA, Kantimirova EA, et al. Circulating microRNAs as Biomarkers of Various Forms of Epilepsy. *Med Sci*. 2025; 13: 7. Available from: <https://doi.org/10.3390/medsci13010007>.
9. Pina-Garza JE, Rosenfeld W, Saeki K, et al. Efficacy and safety of adjunctive perampanel in adolescent patients with epilepsy: Post hoc analysis of six randomized studies. *Epilepsy Behav*. 2020; 104: 106876. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106876>.
10. Rosche J, Plek J, Hildebrandt G, Grossmann A, Kirschstein T, Benecke R. Perampanel in der Behandlung eines Patienten mit Glioblastoma multiforme ohne IHD-1-Mutation und ohne MGMT-Promotor-Methylierung. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2015; 83 (5): 286–9. Available from: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1399459>.
11. Roh TH, Moon JH, Park HH, et al. Association between survival and levetiracetam use in glioblastoma patients treated with temozolomide chemoradiotherapy. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 10783. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67697-w>.
12. Fukuyama K, Ueda Y, Okada M. Effects of Carbamazepine, Lacosamide and Zonisamide on Gliotransmitter Release Associated with Activated Astroglial Hemichannels. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13 (6): 117. Available from: <https://doi.org/10.3390/ph13060117>.

13. Bianconi A, Koumantakis E, Gatto A, Zeppa P, Saaid A, Nico E, et al. Effects of Levetiracetam and Lacosamide on survival and seizure control in IDH-wild type glioblastoma during temozolomide plus radiation adjuvant therapy. *Brain and Spine*. 2024; 4: 102732. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bas.2023.102732>.
14. Василенко А. В., Улитин А. Ю., Аблаев Н. Р., Диконенко М. В., Мансуров А. С., Шайхов М. М. Эпилепсия у больных с глиомами: механизмы, лечение и влияние противосудорожной терапии. *Российский журнал персонализированной медицины*. 2023; 3 (3): 38–47. DOI: 10.18705/2782-3806-2023-3-3-38-47.
15. Копачев Д. Н., Шишкина Л. В., Шкатова А. М., Головтеев А. Л., Троицкий А. А., Гриненко О. А., и др. Глионейрональные опухоли, ассоциированные с эпилепсией. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2022; 122 (4): 127–34. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17116/jnevro2022122041127>.
16. Лебедева А. В., Бурд С. Г., Власов П. Н., Ермоленко Н. А., Жидкова И. А., Зырянов С. К., и др. Лечение эпилепсии, ассоциированной с первичными и метастатическими опухолями головного мозга. Эпилепсия и пароксизмальные состояния. 2021; 13 (3): 286–304. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17749/2077-8333/epi.par.con.2021.099>.

References

1. SLuyken C, Blümcke I, Fimmers R, Urbach H, Elger C, Wiestler O, et al. 2003. The spectrum of longterm epilepsy-associated tumors: long-term seizure and tumor outcome and neurosurgical aspects. *Epilepsia*. 2003; 44: 822–30.
2. Lange F, Hornschemeyer J, Kirschstein T. Glutamatergic Mechanisms in Glioblastoma and Tumor-Associated Epilepsy. *Cells*. 2021; 10 (5): 1226. Available from: <https://doi.org/10.3390/cells10051226>.
3. Venkataramani V, Tanev DI, Strahle C, et al. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature*. 2019; 573 (7775): 532–38. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1564-x>.
4. Yuen TI, Morokoff AP, Bjorksten A, et al. Glutamate is associated with a higher risk of seizures in patients with gliomas. *Neurology*. 2012; 79 (9): 883–9. Available from: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318266fa89>.
5. Lo M, Wang YZ, Gout PW. The x(c)-cystine/glutamate antiporter: a potential target for therapy of cancer and other diseases. *J Cell Physiol*. 2008; 215 (3): 593–602. Available from: <https://doi.org/10.1002/jcp.21366>.
6. Yi L, Fan X, Li J, et al. Enrichment of branched chain amino acid transaminase 1 correlates with multiple biological processes and contributes to poor survival of IDH1 wild-type gliomas. *Aging (Albany NY)*. 2021; 13 (3): 3645–60. Available from: <https://doi.org/10.18632/aging.202328>.
7. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010; 62 (3): 405–96. Available from: <https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>.
8. Timechko EE, Lysova KD, Yakimov AM, Paramonova AI, Vasileva AA, Kantimirova EA, et al. Circulating microRNAs as Biomarkers of Various Forms of Epilepsy. *Med Sci*. 2025; 13: 7. Available from: <https://doi.org/10.3390/medsci13010007>.
9. Pina-Garza JE, Rosenfeld W, Saeki K, et al. Efficacy and safety of adjunctive perampanel in adolescent patients with epilepsy: Post hoc analysis of six randomized studies. *Epilepsy Behav*. 2020; 104: 106876. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106876>.
10. Rosche J, Piek J, Hildebrandt G, Grossmann A, Kirschstein T, Benecke R. Perampanel in der Behandlung eines Patienten mit Glioblastoma multiforme ohne IDH-1-Mutation und ohne MGMT-Promotor-Methylierung. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 2015; 83 (5): 286–9. Available from: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1399459>.
11. Roh TH, Moon JH, Park HH, et al. Association between survival and levetiracetam use in glioblastoma patients treated with temozolomide chemoradiotherapy. *Sci Rep*. 2020; 10 (1): 10783. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67697-w>.
12. Fukuyama K, Ueda Y, Okada M. Effects of Carbamazepine, Lacosamide and Zonisamide on Gliotransmitter Release Associated with Activated Astroglial Hemichannels. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; 13 (6): 117. Available from: <https://doi.org/10.3390/ph13060117>.
13. Bianconi A, Koumantakis E, Gatto A, Zeppa P, Saaid A, Nico E, et al. Effects of Levetiracetam and Lacosamide on survival and seizure control in IDH-wild type glioblastoma during temozolomide plus radiation adjuvant therapy. *Brain and Spine*. 2024; 4: 102732. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bas.2023.102732>.
14. Vasilenko AV, Ulitin AY, Ablaev NR, Dikonenko MV, Mansurov AS, SHajhov M. M. Epilepsiya u bol'nyh s gliomami: mekhanizmy, lechenie i vliyanie protivosudorozhnoj terapii. *Rossiiskij zhurnal personalizirovannoj mediciny*. 2023; 3 (3): 38–47. DOI: 10.18705/2782-3806-2023-3-3-38-47. Russian.
15. Kopachev DN, SHishkina LV, SHkatova AM, Golovtееv AL, Troickij AA, Grinenko OA, i dr. Glionejronal'nye opuholi, associirovannye s epilepsiej. *ZHurnal nevrologii i psichiatrii im. S. S. Korsakova*. 2022; 122 (4): 127–34. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.17116/jnevro2022122041127>. Russian.
16. Lebedeva AV, Burd SG, Vlasov PN, Ermolenko NA, ZHidkova IA, Zyryanov SK, i dr. Lechenie epilepsii, associirovannoj s pervichnymi i metastaticheskimi opuholyami golovnogo mozga. *Epilepsiya i paroksizmal'nye sostoyaniya*. 2021; 13 (3): 286–304. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.17749/2077-8333/epi.par.con.2021.099>. Russian.

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСКРИПТОМНОГО ПРОФИЛЯ FAP⁺-КЛЕТОК В ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПОВА. Ю. Калинин, И. А. Пацкан, М. М. Штадельман, Е. С. Григорьева , Л. А. Таширева

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, Россия

Понимание подтип-специфичной вариабельности функциональных программ FAP⁺ опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ) является фундаментальным для разработки эффективных терапевтических стратегий, нацеленных на стромальные мишени. Целью работы было идентифицировать подтип-специфичные сигнальные пути, маркеры и молекулярные особенности FAP⁺ ОАФ. Исследовали образцы тканей, полученные от 15 пациенток с раком молочной железы (РМЖ). С помощью пространственного транскриптомного анализа продемонстрировано, что FAP⁺ ОАФ при люминальном РМЖ проявляют фенотип, характеризующийся организацией внеклеточного матрикса (GO:0030198, FDR q-value = 0,0307) и экспрессией генов, ассоциированных с метастазированием (*COL10A1*, *MMP13*, *CXCL14*, *TSPAN8*). В отличие от этого, FAP⁺ ОАФ при тройном негативном раке демонстрируют выраженный иммуномодуляторный фенотип со сверхэкспрессией генов иммуносупрессии (*CD36*, *PLA2G2A*, *CHI3L1*) и обогащением сигнальных путей иммунного ответа (иммунный ответ (GO:0006955, FDR q-value = 7,85e-17), ответ на воспаление (GO:0006954, FDR q-value = 2,79e-11), регуляция продукции цитокинов (GO:0001817, FDR q-value = 3,39e-10)). Идентифицированы также подтип-специфичные сигнатуры генов радиорезистентности: люминальные А- и В-подтипы, показана активация путей репарации ДНК (*IGF1R*, *ERBB3*, *CRIP1*), в то время как тройные негативные опухоли демонстрируют обогащение маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и стволовости (*ZEB2*, *NOTCH4*, *FOXM1*). Эти данные подчеркивают, что FAP⁺-фибробласты не являются однородной популяцией, а функционально специализируются в зависимости от подтипа опухоли, выступая в качестве архитекторов стромы при люминальном раке и регуляторов иммунного ответа при тройном негативном РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, опухолевое микроокружение, фибробласты, пространственная транскриптомика

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 25-65-00021).

Вклад авторов: А. Ю. Калинин — написание и оформление статьи; И. А. Пацкан — биоинформатический анализ; М. М. Штадельман — сбор и анализ данных; Е. С. Григорьева — интерпретация полученных данных; Л. А. Таширева — интерпретация полученных данных, разработка концепции. Все авторы участвовали в финальном редактировании статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НИИ онкологии Томского НИМЦ (Протокол № 3 от 25 августа 2020 г.). Работа выполнена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (1964 г.) и ее поправками (1975 и 1983 гг.). Все пациентки предоставили письменное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Евгения Сергеевна Григорьева
Переулоч Кооперативный, д. 7, г. Томск, 634009, Россия; grigoryeva.es@gmail.com

Статья получена: 10.09.2025 **Статья принята к печати:** 08.10.2025 **Опубликована онлайн:** 16.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.046

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/>).

TRANSCRIPTOMIC FEATURES OF FAP⁺ CELLS ACROSS MOLECULAR SUBTYPES OF BREAST CANCERKalinchuk AYu, Patskan IA, Stadelman MM, Grigorieva ES , Tashireva LA

Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Understanding subtype-specific variability of functional programs in FAP⁺ tumor-associated fibroblasts (TAFs) is fundamental for developing effective therapeutic strategies targeting stromal components. The aim of this study was to identify subtype-specific signaling pathways, markers, and molecular features of FAP⁺ TAFs. Using spatial transcriptomic analysis, we demonstrated that FAP⁺ TAFs in luminal breast cancer exhibit a phenotype characterized by extracellular matrix organization (GO:0030198, FDR q-value = 0.0307) and expression of genes associated with metastasis (*COL10A1*, *MMP13*, *CXCL14*, *TSPAN8*). In contrast, FAP⁺ TAFs in triple-negative breast cancer display a pronounced immunomodulatory phenotype with overexpression of immunosuppressive genes (*CD36*, *PLA2G2A*, *CHI3L1*) and enrichment of immune response-related pathways (immune response (GO:0006955, FDR q-value = 7.85e-17), inflammatory response (GO:0006954, FDR q-value = 2.79e-11), regulation of cytokine production (GO:0001817, FDR q-value = 3.39e-10)). We also identified subtype-specific gene signatures related to radioresistance: luminal A and B subtypes showed activation of DNA repair pathways (*IGF1R*, *ERBB3*, *CRIP1*), while triple-negative tumors demonstrated enrichment of epithelial-mesenchymal transition and stemness markers (*ZEB2*, *NOTCH4*, *FOXM1*). These findings emphasize that FAP⁺ fibroblasts are not a homogeneous population but functionally specialize depending on tumor subtype — acting as stromal architects in luminal breast cancer and as regulators of immune response in triple-negative breast cancer.

Keywords: breast cancer, tumor microenvironment, fibroblasts, spatial transcriptomics

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 25-65-00021).

Author contribution: Kalinchuk AYu — writing and formatting; Patskan IA — bioinformatic analysis; Shtadelman MM — data collection and analysis; Grigoryeva ES — interpretation of results; Tashireva LA — interpretation of results, concept development. All authors participated in the final editing of the article.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Ethics Committee of the Tomsk National Research Medical Center of Oncology (Protocol No. 3 dated August 25, 2020). The work was conducted in accordance with the principles of the Helsinki Declaration (1964) and its amendments (1975 and 1983). All patients provided written informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeniya S. Grigoryeva
Koperativny Lane, str. 7, Tomsk, 634009, Russia; grigoryeva.es@gmail.com

Received: 10.09.2025 **Accepted:** 08.10.2025 **Published online:** 16.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.046

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/>).

Гетерогенность рака молочной железы (РМЖ) определяется не только разнообразием опухолевых клеток, но и сложным клеточным составом микроокружения опухоли [1]. Одними из ключевых клеток в микроокружении являются фибробласты — активные участники онкогенеза. Они ремоделируют внеклеточный матрикс [2], опосредуют иммуносупрессию, в частности, создавая физический барьер для иммунокомпетентных клеток [3], секретируют провоспалительные цитокины и факторы роста, которые непосредственно стимулируют пролиферацию опухолевых клеток и ангиогенез [4, 5]. Среди различных субпопуляций опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ) особый интерес представляют фибробласты, экспрессирующие белок активации фибробластов альфа (fibroblast activation protein alpha, FAP), ввиду их исключительной роли в этих процессах. При некоторых карциномах высокий уровень экспрессии FAP является универсальным маркером агрессивной опухолевой стромы и достоверно ассоциирован с неблагоприятным прогнозом [6], однако при раке молочной железы его значение противоречиво. Как известно, молекулярный подтип рака молочной железы имеет весомое прогностическое значение, в том числе за счет особенностей микроокружения, характерных для каждого из них. Исследования с использованием ингибитора FAP, конъюгированного с технецием-99m (^{99m}Tc -iFAP), указывают на то, что экспрессия FAP значимо коррелирует с определенными молекулярными подтипами РМЖ. Так, была выявлена сильная положительная корреляция между значениями накопления препарата в первичной опухоли и их молекулярными подтипами [7]. Авторы исследования особенно отметили, что подтипы HER2⁺ и люминальный В HER2⁺ демонстрировали наивысшие соотношения накопления, что предполагает более выраженную экспрессию FAP, связанную со столь агрессивными фенотипами. Связь экспрессии FAP с клиническими параметрами подтверждается и в другой работе, авторы которой обнаружили, что экспрессия FAP локализуется в строме опухоли и может быть гетерогенной в зависимости от различных характеристик опухоли, однако различия доли клеток с экспрессией FAP между молекулярными подтипами не достигали уровня статистической значимости [8]. Есть сообщение, что определенные субпопуляции ОАФ, обогащенные экспрессией FAP, связаны с подтипом тройного негативного РМЖ [9]. Последующие исследования подтвердили, что фибробласты при РМЖ представляют собой гетерогенную популяцию. Было показано, что люминальный А-подтип

характеризовался большим количеством кластеров, содержащих ОАФ, секретирующих цитокины, в том числе TGF β , а также ОАФ, ассоциированных с внеклеточным матриксом. Напротив, в подтипах Lum В и HER2⁺ и трипл-негативном обнаруживались кластеры, содержащие АФО, ассоциированные с заживлением ран [10]. При люминальном РМЖ более высокие уровни FAP были ассоциированы с отдаленными рецидивами [11]. Тем не менее на сегодняшний день нет прямых данных сравнения транскриптомного профиля FAP⁺ клеток между подтипами.

В то же время ключевой вопрос о том, в какой степени транскриптомный ландшафт и, как следствие, функциональная программа FAP⁺-клеток варьируют между основными молекулярными подтипами РМЖ остается открытым. Понимание этих подтип-специфических различий имеет критически важное значение для разработки новых терапевтических стратегий. На сегодняшний день терапия, нацеленная на FAP, представляет собой одно из перспективных направлений в онкологии. Высокая и специфичная экспрессия FAP на стромальных клетках внутри опухоли в сочетании с его практически полным отсутствием в здоровых тканях делает этот белок идеальной мишенью для создания высокоселективных препаратов. Активно разрабатываются и проходят клинические исследования различные терапевтические модальности, нацеленные на FAP, включая CAR-T-клетки, биспецифичные антитела, конъюгаты антител и лекарственных веществ (ADC) и радиофармацевтические препараты, доставляющие цитотоксические агенты непосредственно в строму [6]. Успех этих инновационных подходов напрямую зависит от глубокого понимания биологии мишени. Гетерогенность FAP⁺-клеток среди подтипов РМЖ может приводить к неодинаковой эффективности препаратов, что диктует необходимость их стратификации. В данном исследовании мы провели сравнительный анализ транскриптомных профилей FAP⁺-клеток, ассоциированных с люминальным и тройным негативным подтипами РМЖ. Нашей целью было идентифицировать подтип-специфичные сигнальные пути, маркеры и молекулярные особенности этой популяции.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование были включены образцы тканей, полученные от 15 пациенток. Критерии включения:

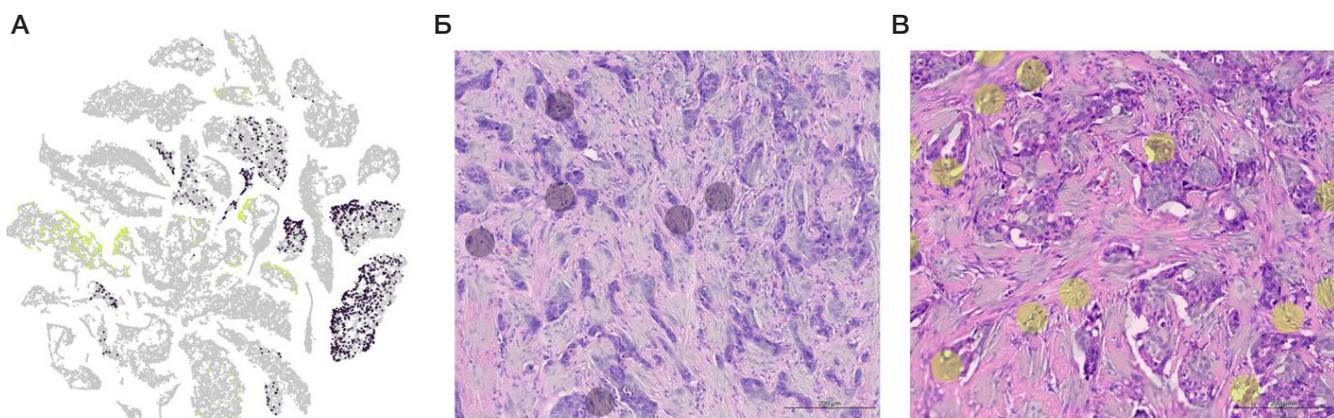


Рис. 1. А. Кластеры FAP⁺-регионов у люминальных (синий цвет) и тройных негативных (желтый цвет) пациентов, полученные посредством объединения данных в программном обеспечении Space Ranger v1.3. Б. Срез ткани опухоли люминального подтипа с выделенными FAP⁺-регионами (синий цвет). В. Срез ткани опухоли тройного негативного подтипа с выделенными FAP⁺-регионами (желтый цвет)

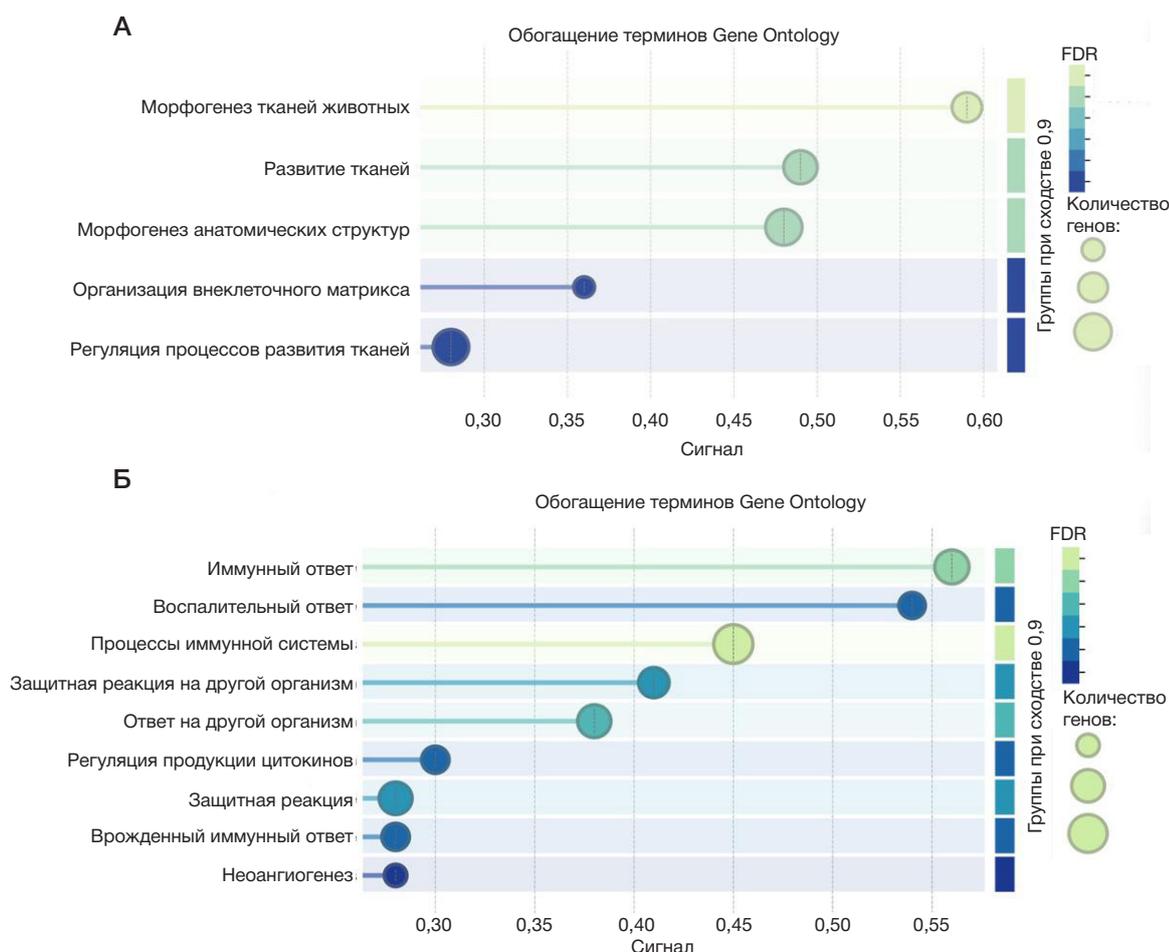


Рис. 2. Значимые сигнальные пути, активированные в FAP⁺-областях люминальных (А) и тройных негативных (Б) опухолей молочной железы. FDR — коэффициент ложных срабатываний

морфологически подтвержденный люминальный A/B ($n = 7$) и тройной негативный ($n = 8$) РМЖ. Критерии исключения: наличие HER2-позитивных подтипов. Для проведения пространственного транскриптомного анализа использовали срезы тканей, полученных в ходе трипан-биопсии или при хирургическом вмешательстве до проведения лечения, фиксированные в формалине и залитых в парафин. Данные секвенирования срезов тканей РМЖ, использованные в данной публикации, доступны в базе данных GEO под номером доступа GSE242311. Подробные описания подготовки гистологических образцов, создания библиотеки и секвенирования с использованием платформы 10X Visium можно найти в оригинальных статьях [12, 13].

Биоинформатический анализ данных

Первичная обработка исходных данных в формате FASTQ была выполнена с использованием программного обеспечения Space Ranger v1.3 (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США) со стандартными параметрами. Выравнивание файлов FASTQ проводили относительно референсного генома человека (GRCh38). Агрегацию срезов тканей для последующей ручной аннотации выполняли с использованием функции "spaceranger agg". Ручную аннотацию срезов проводили в программе Loupe Browser v8.1.2 (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США), и она включала идентификацию регионов с уровнем экспрессии FAP выше 3, которые анализировали отдельно

для пациентов с люминальным и трижды негативным раком (рис. 1).

Каждый отобранный регион был оценен врачом-патологоанатомом для подтверждения наличия фибробластов. Регионы, не содержащие фибробласты, вручную исключали из кластера. Анализ дифференциальной экспрессии генов между аннотированными кластерами проводили с использованием встроенных инструментов Loupe Browser v8.1.2 (10x Genomics, Плезантон, Калифорния, США). Гены с \log fold change (LFC) $> 0,58$ и скорректированными p -значениями (FDR) $< 0,05$ считали дифференциально экспрессированными. Для визуализации аннотированных клеточных кластеров в пространстве пониженной размерности применяли метод t -SNE с использованием встроенных инструментов Loupe Browser. Анализ обогащения функциональных путей проводили с использованием онлайн-ресурса STRING [14] на основе базы данных Gene Ontology [15] с применением списков дифференциально экспрессированных генов, ранжированных по уровню экспрессии и скорректированным p -значениям (FDR q -value), полученным из анализа дифференциальной экспрессии. Биологические процессы с FDR q -value $< 0,05$ считали значимыми. Дополнительный анализ выполняли в среде R (<https://www.R-project.org/>) с использованием пакета Seurat (v5.0.0) [16]. Каждый из 15 образцов был преобразован в объект Seurat с помощью команды "Load10X_Spatial" и затем объединен в единый объект с использованием функции "merge". Предобработка данных

включала в себя фильтрацию регионов с параметрами "nCount_Spatial" > 500 и "nFeature_Spatial" > 200. Результаты ручной аннотации, экспортированные из Loupe Browser v8.1.2 в виде таблиц, были включены в раздел метаданных каждого соответствующего образца.

Для генерации усредненных транскриптомных профилей из аннотированных FAP-позитивных регионов для каждого образца использовали функцию "AggregateExpression" из пакета Seurat (v5.0.0) с параметрами slot = "counts", normalization.method = "LogNormalize" и scale.factor = 10 000. В результате было получено 15 транскриптомных профилей, каждый из которых представлял усредненные уровни экспрессии всех регионов соответствующего образца. Эти профили были нормализованы с использованием масштабного фактора 10,000 и подвергнуты логарифмическому преобразованию. Для визуализации экспрессии сигнатур генов фибробластов и радиорезистентности в исследованных образцах были созданы тепловые карты в среде R (<https://www.R-project.org/>) с использованием пакетов pheatmap (v1.0.13) [17], RColorBrewer (v1.1-3) [18] и dplyr (vX.X.X) [19]. Визуализация тепловых карт включала этап Z-score стандартизации матрицы экспрессии целевых генов по строкам (генам). Данная биоинформатическая обработка позволила провести анализ дифференциальной экспрессии генов в двух группах образцов РМЖ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологические процессы, обогащенные в FAP⁺-областях люминальных и тройных негативных опухолей

Для понимания различий в биологических процессах между двумя кластерами люминальных и тройных негативных опухолей мы провели анализ обогащения сигнальных путей (pathway enrichment analysis), чтобы выявить обогащенные молекулярные процессы в транскрипционных данных. Были идентифицированы наиболее значимые пути из наборов данных Gene Ontology (рис. 2).

Проведенное исследование позволило выявить ключевые биологические процессы, активированные в FAP⁺-областях у пациентов с люминальным и тройным негативным РМЖ. FAP⁺-области у пациентов с люминальным РМЖ характеризовались активацией процессов морфогенеза (GO:0009887, FDR q-value = 0,00058), развития тканей (GO:0009888, FDR q-value = 0,0013) и организацией внеклеточного матрикса (GO:0030198, FDR q-value = 0,0307), в то время как у пациентов с тройным негативным раком преобладали иммунные сигнальные пути (иммунный ответ (GO:0006955, FDR q-value = 7,85e⁻¹⁷), ответ на воспаление (GO:0006954, FDR q-value = 2,79e⁻¹¹), регуляция продукции цитокинов (GO:0001817, FDR q-value = 3,39e⁻¹⁰)), а также ангиогенез (GO:0001525, FDR q-value = 7,83e⁻⁰⁸).

Маркеры фибробластов в FAP⁺-областях опухоли

Затем мы отобрали специфичные для фибробластов высокоэкспрессируемые и значимо обогащенные гены в двух группах пациентов с РМЖ. Эти гены были аннотированы как функционально важные в развитии рака (рис. 3).

В образцах люминального подтипа список генов с дифференциальной экспрессией включал *ASPN*, *COL10A1*, *COL2A1*, *OMD*, *DCN*, *MMP13*, *SERPINA1/SERPINA3*, *PLAT*, *LRR15*, *CXCL14*, *TSPAN8*, а в тройных негативных

опухолях — *MMP7*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL15A1*, *ENG*, *TGM2*, *SLC11A1*, *CHI3L1*, *PLA2G2A*, *FDCSP*, *CD36*.

Сигнатуры генов, связанные с резистентностью к лучевой терапии

Важная особенность FAP⁺-клеток — их радиочувствительность/резистентность, поскольку FAP является перспективным таргетом для радионуклидной терапии. В этой связи мы отобрали среди гиперэкспрессированных генов те, которые патогенетически связаны с радиорезистентностью по данным литературы, в двух группах пациентов с РМЖ (рис. 4).

Так, в люминальном раке была обнаружена экспрессия генов *IGF1R*, *ERBB3*, *GREB1*, *XBP1*, *SERPINA1 / SERPINA3*, *TIMP3*, *FASN*, *IL6ST*, *BCAM*, *CRIP1*. Тем временем в тройных негативных опухолях были гиперэкспрессированы гены *CD36*, *CX3CL1*, *A2M*, *MYBL2*, *NOTCH4*, *S100A8 / S100A9*, *TGM2*, *UBE2C*, *FOXM1*, *ZEB2*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ позволил выявить фундаментальные различия в биологических функциях FAP⁺-клеток в микроокружении люминального и тройного негативного подтипов рака молочной железы. Эти данные не только подчеркивают гетерогенность стромы опухоли, но и имеют важное значение для разработки персонализированных терапевтических стратегий, в частности, для таргетной терапии с использованием FAP в качестве мишени.

Ключевым результатом нашего исследования является четкое разделение роли стромальных FAP⁺-клеток в зависимости от молекулярного подтипа опухоли. В люминальном РМЖ FAP⁺-клетки демонстрируют выраженную активность процессов морфогенеза, развития тканей и организации внеклеточного матрикса и отсутствие экспрессии генов, ответственных за развитие воспалительных реакций. Это согласуется с идентифицированными генами, маркерами фибробластов, такими как *COL10A1*, *COL2A1*, *MMP13*, *CXCL14* и *TSPAN8*. В частности, высокая экспрессия *MMP13* в FAP⁺-клетках указывает на активное ремоделирование матрикса [20]. Среди обнаруженных генов необходимо отметить ассоциированные с химиорезистентностью РМЖ. Так, экспрессия *CXCL14* по данным механистических исследований является отличительным признаком фибробластов, усиливающих метастазирование и поддерживающих химиорезистентность [21], как и *TSPAN8*, экспрессируемого миофибробластами [22]. Такая стромальная ниша, вероятно, обеспечивает структурную поддержку опухоли, способствует ее прогрессии и резистентности к терапии, создавая жесткое десмопластическое микроокружение.

В тройном негативном РМЖ FAP⁺-клетки, напротив, проявляют ярко выраженный иммуномодулирующий и провоспалительный фенотип. Обогащение сигнальных путей, связанных с иммунным ответом и регуляцией цитокинов, а также гиперэкспрессия генов *CHI3L1*, *CD36* и *PLA2G2A* свидетельствует об активном взаимодействии с иммунными клетками микроокружения. Известно, что CD36⁺-фибробласты обладают мощным иммуносупрессорным эффектом [23] за счет подавления макрофагов, в то время как PLA2G2A⁺-фибробласты препятствуют эффектам CD8⁺-цитотоксических лимфоцитов [24]. Показано, что фибробласты могут секретировать CHI3L1, что приводит к повышению IL8 и стимулирует ангиогенез

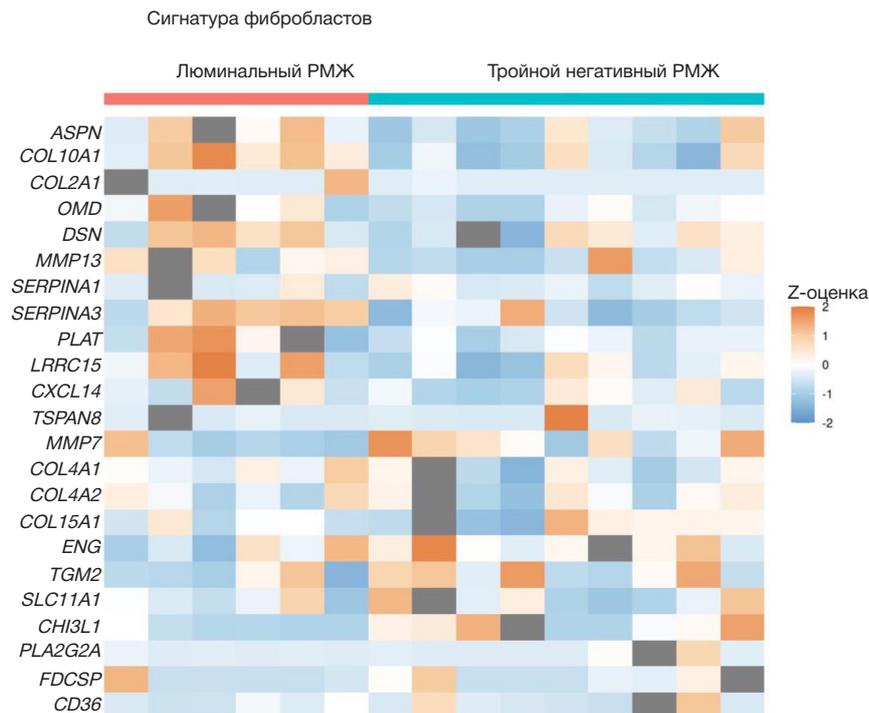


Рис. 3. Фибробласт-специфичные гены в FAP⁺-областях люминальных и тройных негативных опухолей молочной железы

[25]. Все это может способствовать формированию иммуносупрессивной среды, уклонению опухоли от иммунного надзора и поддержанию хронического воспаления. Таким образом, полученные данные указывают на существенные различия в молекулярных сигнатурах опухоль-ассоциированных фибробластов опухолей различных молекулярно-биологических подтипов.

Понимание радиочувствительности FAP⁺-клеток критически важно для разработки методов FAP-таргетной радионуклидной терапии. Наши данные выявили потенциальные предпосылки для функционирования различных механизмов радиорезистентности в двух подтипах. В люминальном подтипе выявленные гены указывают на активацию путей выживания и репарации.

IGF1R и ERBB3 — известные рецепторные тирозинкиназы, опосредующие радиорезистентность при злокачественных новообразованиях [26, 27]. Показано, что ген *SERPINA1* ассоциирован с радиорезистентностью при раке легкого [28], а ингибирование *FASN* улучшает результаты радиотерапии при раке молочной железы [29]. Еще один ген, *CRIP1*, способен взаимодействовать с *BRCA2*, усиливая репарацию ДНК на фоне химиотерапии [30]. Это позволяет предположить, что радиорезистентность в данном подтипе может опосредоваться через усиление репарации ДНК.

В тройном негативном раке профиль генов радиорезистентности более широк и связан с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) и стволовостью. *ZEB2* и *NOTCH4* — ключевые индукторы ЭМП, ассоциированного

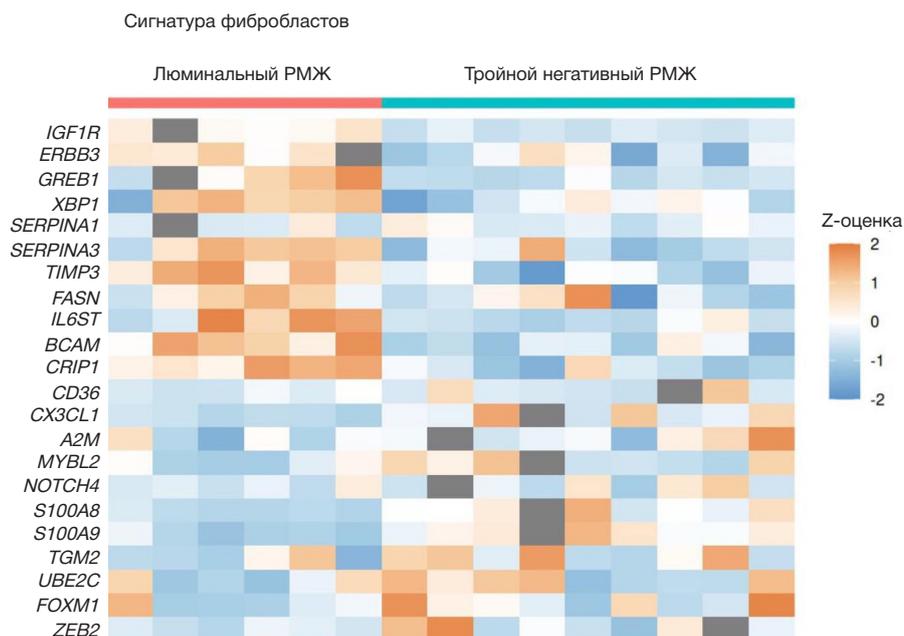


Рис. 4. Гены, ассоциированные с радиорезистентностью, в FAP⁺-областях люминальных и тройных негативных опухолей молочной железы

с устойчивостью к терапии [31–33]. *FOXM1* и *UBE2C* регулируют клеточный цикл и митоз, способствуя быстрому восстановлению популяции опухолевых клеток [34, 35]. Кроме того, усиленная репарация ДНК, зависящая от FoxO3a/FoxM1, может играть ключевую роль в сохранении устойчивых к гибели фибробластов после облучения [36]. TGM2 также связан с устойчивостью к радиотерапии [37]. Это указывает на то, что в тройном негативном РМЖ резистентность может быть связана с наличием популяции стволово-подобных опухолевых клеток с мезенхимными свойствами.

Наше исследование демонстрирует, что FAP⁺-фибробласты не являются однотипной популяцией, а функционально адаптируются к специфике молекулярного подтипа. В люминальном РМЖ они выступают как архитекторы стромы, в то время как в тройном негативном РМЖ — как иммунные регуляторы и промоторы ангиогенеза.

Литература

- Soongsathitanon J, Jamjuntra P, Sumransub N, Yangngam S, de la Fuente M, Landskron G, et al. Crosstalk between tumor-infiltrating immune cells and cancer-associated fibroblasts in tumor growth and immunosuppression of breast cancer. *J Immunol Res.* 2021; 2021: 8840066. DOI: 10.1155/2021/8840066.
- Ohlund D, Elyada E, Tsvetkov D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med.* 2014; 211 (8): 1503–23. DOI: 10.1084/jem.20140692.
- Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7: 60. DOI: 10.3389/fcell.2019.00060.
- Ershaid N, Sharon Y, Doron H, Raz Y, Shani O, Cohen N, et al. Nlrp3 inflammasome in fibroblasts links tissue damage with inflammation in breast cancer progression and metastasis. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4375. DOI: 10.1038/s41467-019-12370-8.
- Suh J, Kim DH, Lee YH, Jang JH, Suh YJ. Fibroblast growth factor-2, derived from cancer-associated fibroblasts, stimulates growth and progression of human breast cancer cells via Fgfr1 signaling. *Mol Carcinog.* 2020; 59 (9): 1028–40. DOI: 10.1002/mc.23233.
- Fitzgerald AA, Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* 2020; 39 (3): 783–803. DOI: 10.1007/s10555-020-09909-3.
- Vallejo-Armenta P, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, García-Pérez FO, Casanova-Triviño P, Sandoval-Bonilla B, et al. [99mTc] Tc-iFAP/SPECT tumor stroma imaging: acquisition and analysis of clinical images in six different cancer entities. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022; 15(6): 729. DOI: 10.3390/ph15060729.
- Tchou J, Zhang PJ, Bi Y, Satija C, Marjundar R, Stephen TL, et al. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer. *Hum Pathol.* 2013; 44 (11): 2549–57. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.06.016.
- Mohammed Ali DA, Salah H. Immunohistochemical study of fibroblast activation protein and α -smooth muscle actin expression and distribution in triple negative breast cancer. *Int J Cancer Biomed Res.* 2020; 4 (1): 27–34. DOI: 10.21608/jcbr.2020.26388.1020.
- Croizer H, Mhaidly R, Kieffer Y, et al. Deciphering the spatial landscape and plasticity of immunosuppressive fibroblasts in breast cancer. *Nat Commun.* 2024; 15: 2806. DOI: 10.1038/s41467-024-47068-z.
- Bonneau C, Eliès A, Kieffer Y, Bourachot B, Ladoire S, Pelon F, et al. A subset of activated fibroblasts is associated with distant relapse in early luminal breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020; 22 (1): 76. DOI: 10.1186/s13058-020-01311-9.
- Tashireva L, Grigoryeva E, Alifanov V, Iamshchikov P, Zavyalova M, Perelmuter V, et al. Spatial Heterogeneity of Integrins and Their Ligands in Primary Breast Tumors. *Discov Med.* 2023; 35 (178): 910–20. DOI: 10.24976/Discov.Med.202335178.86.
- Tashireva LA, Kalinchuk AY, Gerashchenko TS, Menyailo M, Khozyainova A, Denisov EV, Perelmuter VM, et al. Spatial Profile of Tumor Microenvironment in PD-L1-Negative and PD-L1-Positive Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (2): 1433. DOI: 10.3390/ijms24021433.
- Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 2023; 51 (D1): D638–D646. DOI: 10.1093/nar/gkac1000.
- The Gene Ontology Consortium, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics.* 2023; 224 (1): iyad031. DOI: 10.1093/genetics/iyad031.
- Hao Y, Stuart T, Kowalski MH, et al. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis. *Nat Biotechnol.* 2024; 42 (2): 293–304. DOI: 10.1038/s41587-023-01767-y.
- Kolde R, et al. pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.13. 2025. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>.
- Neuwirth E, et al. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-3. 2022. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>.
- Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D, et al. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.4. 2025. Available from: <https://dplyr.tidyverse.org>.
- Sun X, Hu X. Unveiling matrix metalloproteinase 13's dynamic role in breast cancer: a link to physical changes and prognostic modulation. *Int J Mol Sci.* 2025; 26 (7): 3083. DOI: 10.3390/ijms26073083.
- Xu W, Yang H, Xu K, Zhu A, Hall SRR, Jia Y, et al. Transitional CXCL14+ cancer-associated fibroblasts enhance tumour metastasis and confer resistance to EGFR-TKIs, revealing therapeutic vulnerability to filgotinib in lung adenocarcinoma. *Clin Transl Med.* 2025; 15 (4): e70281. DOI: 10.1002/ctm2.70281.
- Fan G, Yu B, Tang L, Zhu R, Chen J, Zhu Y, et al. TSPAN8+ myofibroblastic cancer-associated fibroblasts promote chemoresistance in patients with breast cancer. *Sci Transl Med.* 2024; 16 (741): eadj5705. DOI: 10.1126/scitranslmed.adj5705.
- Zhu GQ, Tang Z, Huang R, et al. CD36+ cancer-associated fibroblasts provide immunosuppressive microenvironment for hepatocellular carcinoma via secretion of macrophage migration inhibitory factor. *Cell Discov.* 2023; 9: 25. DOI: 10.1038/s41421-023-00529-z.
- Ge W, Yue M, Lin R, Zhou T, Xu H, Wang Y, et al. PLA2G2A+ cancer-associated fibroblasts mediate pancreatic cancer immune escape via impeding antitumor immune response of CD8+ cytotoxic T cells. *Cancer Lett.* 2023; 558: 216095. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216095.
- Watanabe K, Shiga K, Maeda A, Harata S, Yanagita T, Suzuki T, et al. Chitinase 3-like 1 secreted from cancer-associated fibroblasts promotes tumor angiogenesis via interleukin-8 secretion in colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2022; 60 (1): 3. DOI: 10.3892/ijo.2021.5293.
- Simpson AD, Soo YWJ, Rieunier G, et al. Type 1 IGF receptor

Выводы

Исследование позволило обнаружить высокоспецифичные транскриптомные портреты FAP⁺-стромы люминального и тройного негативного молекулярных подтипов РМЖ. Полученные данные подчеркивают необходимость учета молекулярного подтипа опухоли при разработке строма-направленной терапии и открывают новые возможности для создания персонализированных комбинированных методов лечения, нацеленных на специфические механизмы устойчивости в микроокружении опухоли.

- associates with adverse outcome and cellular radioresistance in paediatric high-grade glioma. *Br J Cancer*. 2020; 122: 624–9. DOI: 10.1038/s41416-019-0677-1.
27. Chen Y, Lu A, Hu Z, Li J, Lu J. ERBB3 targeting: a promising approach to overcoming cancer therapeutic resistance. *Cancer Lett*. 2024; 599: 217146. DOI: 10.1016/j.canlet.2024.217146.
 28. Huang W, Ding X. Serum biomarkers analyzed by LC-MS/MS as predictors for short outcome of non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Neoplasma*. 2013; 60: 11–18.
 29. Chen CI, Kuo DY, Chuang HY. FASN inhibition shows the potential for enhancing radiotherapy outcomes by targeting glycolysis, AKT, and ERK pathways in breast cancer. *Int J Radiat Biol*. 2025; 101 (3): 292–303. DOI: 10.1080/09553002.2024.2446585.
 30. Sun H, Zhou R, Zheng Y, et al. CRIP1 cooperates with BRCA2 to drive the nuclear enrichment of RAD51 and to facilitate homologous repair upon DNA damage induced by chemotherapy. *Oncogene*. 2021; 40: 5342–55. DOI: 10.1038/s41388-021-01932-0.
 31. Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res*. 2011; 1 (7): 897–912.
 32. Vandamme N, Denecker G, Bruneel K, et al. The EMT transcription factor ZEB2 promotes proliferation of primary and metastatic melanoma while suppressing an invasive, mesenchymal-like phenotype. *Cancer Res*. 2020; 80 (14): 2983–95. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2373.
 33. Yahyanejad S, Theys J, Vooijs M. Targeting Notch to overcome radiation resistance. *Oncotarget*. 2016;7(7):7610-28. DOI: 10.18632/oncotarget.6714.
 34. Xiu G, Sui X, Wang Y, Zhang Z. FOXM1 regulates radiosensitivity of lung cancer cell partly by upregulating KIF20A. *Eur J Pharmacol*. 2018; 833: 79–85. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.04.021.
 35. Zhao M, Li J, Wang R, Mi L, Gu Y, Chen R, et al. Ubiquitination-binding enzyme 2C is associated with cancer development and prognosis and is a potential therapeutic target. *Onco Targets Ther*. 2024; 17: 1159–71. DOI: 10.2147/OTT.S485053.
 36. Im J, Lawrence J, Seelig D, et al. FoxM1-dependent RAD51 and BRCA2 signaling protects idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts from radiation-induced cell death. *Cell Death Dis*. 2018; 9: 584. DOI: 10.1038/s41419-018-0652-4.
 37. Sun C, Du Z, Yang W, Wang Q. Transglutaminase 2 nuclear localization enhances glioblastoma radiation resistance. *Discov Oncol*. 2025; 16 (1): 952. DOI: 10.1007/s12672-025-02599-9.

References

1. Soongsathitanon J, Jamjuntra P, Sumransub N, Yangngam S, de la Fuente M, Landskron G, et al. Crosstalk between tumor-infiltrating immune cells and cancer-associated fibroblasts in tumor growth and immunosuppression of breast cancer. *J Immunol Res*. 2021; 2021: 8840066. DOI: 10.1155/2021/8840066.
2. Ohlund D, Elyada E, Tuxeson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014; 211 (8): 1503–23. DOI: 10.1084/jem.20140692.
3. Liu T, Zhou L, Li D, Andl T, Zhang Y. Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment. *Front Cell Dev Biol*. 2019; 7: 60. DOI: 10.3389/fcell.2019.00060.
4. Ershaid N, Sharon Y, Doron H, Raz Y, Shani O, Cohen N, et al. Nlrp3 inflammasome in fibroblasts links tissue damage with inflammation in breast cancer progression and metastasis. *Nat Commun*. 2019; 10 (1): 4375. DOI: 10.1038/s41467-019-12370-8.
5. Suh J, Kim DH, Lee YH, Jang JH, Surh YJ. Fibroblast growth factor-2, derived from cancer-associated fibroblasts, stimulates growth and progression of human breast cancer cells via Fgfr1 signaling. *Mol Carcinog*. 2020; 59 (9): 1028–40. DOI: 10.1002/mc.23233.
6. Fitzgerald AA, Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy. *Cancer Metastasis Rev*. 2020; 39 (3): 783–803. DOI: 10.1007/s10555-020-09909-3.
7. Vallejo-Armenta P, Ferro-Flores G, Santos-Cuevas C, García-Pérez FO, Casanova-Triviño P, Sandoval-Bonilla B, et al. [99mTc] Tc-iFAP/SPECT tumor stroma imaging: acquisition and analysis of clinical images in six different cancer entities. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(6):729. DOI: 10.3390/ph15060729.
8. Tchou J, Zhang PJ, Bi Y, Satija C, Marjumdar R, Stephen TL, et al. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2013; 44 (11): 2549–57. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.06.016.
9. Mohammed Ali DA, Salah H. Immunohistochemical study of fibroblast activation protein and α -smooth muscle actin expression and distribution in triple negative breast cancer. *Int J Cancer Biomed Res*. 2020; 4 (1): 27–34. DOI: 10.21608/jcbr.2020.26388.1020.
10. Croizer H, Mhaidly R, Kieffer Y, et al. Deciphering the spatial landscape and plasticity of immunosuppressive fibroblasts in breast cancer. *Nat Commun*. 2024; 15: 2806. DOI: 10.1038/s41467-024-47068-z.
11. Bonneau C, Eliès A, Kieffer Y, Bourachot B, Ladoire S, Pelon F, et al. A subset of activated fibroblasts is associated with distant relapse in early luminal breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2020; 22 (1): 76. DOI: 10.1186/s13058-020-01311-9.
12. Tashireva L, Grigoryeva E, Alifanov V, Iamshchikov P, Zavyalova M, Perelmuter V, et al. Spatial Heterogeneity of Integrins and Their Ligands in Primary Breast Tumors. *Discov Med*. 2023; 35 (178): 910–20. DOI: 10.24976/Discov.Med.202335178.86.
13. Tashireva LA, Kalinchuk AY, Gerashchenko TS, Menyailo M, Khozyainova A, Denisov EV, Perelmuter VM, et al. Spatial Profile of Tumor Microenvironment in PD-L1-Negative and PD-L1-Positive Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (2): 1433. DOI: 10.3390/ijms24021433.
14. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*. 2023; 51 (D1): D638–D646. DOI: 10.1093/nar/gkac1000.
15. The Gene Ontology Consortium, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*. 2023; 224 (1): iyad031. DOI: 10.1093/genetics/iyad031.
16. Hao Y, Stuart T, Kowalski MH, et al. Dictionary learning for integrative, multimodal and scalable single-cell analysis. *Nat Biotechnol*. 2024; 42 (2): 293–304. DOI: 10.1038/s41587-023-01767-y.
17. Kolde R, et al. pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.13. 2025. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>.
18. Neuwirth E, et al. RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-3. 2022. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>.
19. Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D, et al. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.4. 2025. Available from: <https://dplyr.tidyverse.org>.
20. Sun X, Hu X. Unveiling matrix metalloproteinase 13's dynamic role in breast cancer: a link to physical changes and prognostic modulation. *Int J Mol Sci*. 2025; 26 (7): 3083. DOI: 10.3390/ijms26073083.
21. Xu W, Yang H, Xu K, Zhu A, Hall SRR, Jia Y, et al. Transitional CXCL14+ cancer-associated fibroblasts enhance tumour metastasis and confer resistance to EGFR-TKIs, revealing therapeutic vulnerability to filgotinib in lung adenocarcinoma. *Clin Transl Med*. 2025; 15 (4): e70281. DOI: 10.1002/ctm2.70281.
22. Fan G, Yu B, Tang L, Zhu R, Chen J, Zhu Y, et al. TSPAN8+ myofibroblastic cancer-associated fibroblasts promote chemoresistance in patients with breast cancer. *Sci Transl Med*. 2024; 16 (741): ead5705. DOI: 10.1126/scitranslmed.ad5705.
23. Zhu GQ, Tang Z, Huang R, et al. CD36+ cancer-associated fibroblasts provide immunosuppressive microenvironment for hepatocellular carcinoma via secretion of macrophage migration inhibitory factor. *Cell Discov*. 2023; 9: 25. DOI: 10.1038/s41421-023-00529-z.
24. Ge W, Yue M, Lin R, Zhou T, Xu H, Wang Y, et al. PLA2G2A+ cancer-associated fibroblasts mediate pancreatic cancer immune escape via impeding antitumor immune response of CD8+ cytotoxic T cells. *Cancer Lett*. 2023; 558: 216095. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216095.
25. Watanabe K, Shiga K, Maeda A, Harata S, Yanagita T, Suzuki T, et al. Chitinase 3-like 1 secreted from cancer-associated fibroblasts promotes tumor angiogenesis via interleukin-8 secretion in colorectal

- cancer. *Int J Oncol.* 2022; 60 (1): 3. DOI: 10.3892/ijo.2021.5293.
26. Simpson AD, Soo YWJ, Rieunier G, et al. Type 1 IGF receptor associates with adverse outcome and cellular radioresistance in paediatric high-grade glioma. *Br J Cancer.* 2020; 122: 624–9. DOI: 10.1038/s41416-019-0677-1.
 27. Chen Y, Lu A, Hu Z, Li J, Lu J. ERBB3 targeting: a promising approach to overcoming cancer therapeutic resistance. *Cancer Lett.* 2024; 599: 217146. DOI: 10.1016/j.canlet.2024.217146.
 28. Huang W, Ding X. Serum biomarkers analyzed by LC-MS/MS as predictors for short outcome of non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy. *Neoplasma.* 2013; 60: 11–18.
 29. Chen CI, Kuo DY, Chuang HY. FASN inhibition shows the potential for enhancing radiotherapy outcomes by targeting glycolysis, AKT, and ERK pathways in breast cancer. *Int J Radiat Biol.* 2025; 101 (3): 292–303. DOI: 10.1080/09553002.2024.2446585.
 30. Sun H, Zhou R, Zheng Y, et al. CRIP1 cooperates with BRCA2 to drive the nuclear enrichment of RAD51 and to facilitate homologous repair upon DNA damage induced by chemotherapy. *Oncogene.* 2021; 40: 5342–55. DOI: 10.1038/s41388-021-01932-0.
 31. Sánchez-Tilló E, Siles L, de Barrios O, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, et al. Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *Am J Cancer Res.* 2011; 1 (7): 897–912.
 32. Vandamme N, Denecker G, Bruneel K, et al. The EMT transcription factor ZEB2 promotes proliferation of primary and metastatic melanoma while suppressing an invasive, mesenchymal-like phenotype. *Cancer Res.* 2020; 80 (14): 2983–95. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2373.
 33. Yahyanejad S, Theys J, Vooijs M. Targeting Notch to overcome radiation resistance. *Oncotarget.* 2016;7(7):7610-28. DOI: 10.18632/oncotarget.6714.
 34. Xiu G, Sui X, Wang Y, Zhang Z. FOXM1 regulates radiosensitivity of lung cancer cell partly by upregulating KIF20A. *Eur J Pharmacol.* 2018; 833: 79–85. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.04.021.
 35. Zhao M, Li J, Wang R, Mi L, Gu Y, Chen R, et al. Ubiquitination-binding enzyme 2C is associated with cancer development and prognosis and is a potential therapeutic target. *Onco Targets Ther.* 2024; 17: 1159–71. DOI: 10.2147/OTT.S485053.
 36. Im J, Lawrence J, Seelig D, et al. FoxM1-dependent RAD51 and BRCA2 signaling protects idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts from radiation-induced cell death. *Cell Death Dis.* 2018; 9: 584. DOI: 10.1038/s41419-018-0652-4.
 37. Sun C, Du Z, Yang W, Wang Q. Transglutaminase 2 nuclear localization enhances glioblastoma radiation resistance. *Discov Oncol.* 2025; 16 (1): 952. DOI: 10.1007/s12672-025-02599-9.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ЭКСПАНСИИ АКТИВИРОВАННЫХ ИЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ В-КЛЕТОК

С. Р. Соколова, И. Л. Григорова [✉]

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

Культуры В-клеток *in vitro* имеют важное значение для фундаментальной и прикладной науки: они могут быть использованы для изучения антигенной специфичности В- и Т-клеток, а также для получения моноклональных антител и других биопрепаратов. Поэтому создание оптимальных протоколов культивирования активированных В-клеток, антитело-секретирующих клеток (АСК) и В-клеток герминативных центров (ГЦ) *in vitro* остается актуальной задачей. Целью работы было подобрать условия, обеспечивающие: высокий уровень экспансии и выживаемости В-клеток, накопление АСК, образование и накопление В-клеток ГЦ. Для этого В-клетки CD27⁻ и/или CD27⁺ из периферической крови человека культивировали в присутствии фидерной линии 3T3-hCD40L, различных комбинаций цитокинов (IL21, IL4, BAFF), компонентов человеческой сыворотки или в контрольных условиях в течение 7 дней. Цитофлуориметрический анализ В-клеточных культур показал, что совместное присутствие CD40L и IL21 необходимо для достижения высокой экспансии, выживаемости и дифференцировки В-клеток с образованием CD27^{high}CD38^{high} АСК и CD95^{high}Bcl-6⁺ ГЦ-подобных клеток. Наибольшая экспансия наблюдалась в культурах из CD27-наивных клеток в присутствии компонентов человеческой сыворотки, добавление IL4 умеренно повышало долю ГЦ-подобных клеток. Максимальное накопление АСК наблюдалось в культурах из CD27⁺-В-клетки памяти. Разработанный подход позволил подобрать оптимальные условия для культивирования В-клеток *in vitro*, а также наглядно продемонстрировал влияние как отдельных цитокинов IL-21, IL-4, BAFF, так и их комбинаций на В-клеточные культуры из различных субпопуляций.

Ключевые слова: В-клетки, антитело-секретирующие клетки, АСК, В-клетки герминативных центров, ГЦ, культуры лимфоцитов человека *in vitro*, 3T3-CD40L

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00545).

Благодарности: авторы благодарны Е. Закадиной за помощь в редактировании статьи.

Вклад авторов: И. Л. Григорова — дизайн исследования, концепция статьи, редактирование, утверждение конечного варианта статьи; С. Р. Соколова — постановка экспериментов, обработка результатов, написание текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 240 от 23 мая 2024 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Леонидовна Григорова
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; grig76@gmail.com

Статья получена: 26.09.2025 **Статья принята к печати:** 10.10.2025 **Опубликована онлайн:** 30.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.053

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/>).

OPTIMIZATION OF HUMAN B CELL CULTURE CONDITIONS FOR EXPANSION OF ACTIVATED OR DIFFERENTIATED B CELLS

Sokolova SR, Grigороva IL [✉]

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In vitro B cell cultures are important for fundamental and applied science: these can be used to study antigenic specificity of B and T cells, as well as to produce monoclonal antibodies and other biopharmaceuticals. That is why the development of an optimal protocol for culturing of activated B cells, antibody-secreting cells (ASCs), and germinal center (GC) B cells *in vitro* remains an urgent task. The study aimed to find the conditions ensuring the following: high B cell expansion and survival rates, ASC accumulation, GC B cell production and accumulation. For that the CD27⁻ and/or CD27⁺ B cells from human peripheral blood were cultured in the presence of the feeder 3T3-hCD40L line, various combinations of cytokines (IL21, IL4, BAFF), human serum components or under the control conditions throughout 7 days. Flow cytometry analysis of B cell cultures showed that the CD40L and IL21 co-existence was essential for achieving high B cell expansion, survival, and differentiation with the production of the CD27^{high}CD38^{high} ASCs and CD95^{high}Bcl-6⁺ GC-like cells. The highest expansion was observed in the cultures of CD27 naïve cells in the presence of human serum components. The IL4 supplementation moderately increased the share of GC-like cells. The maximum ASC accumulation was observed in the cultures of CD27⁺ memory B cells. The approach developed made it possible to find the optimal conditions for *in vitro* B cell culturing and clearly demonstrated the impact of both individual IL-21, IL-4, BAFF cytokines and their combinations on the B cell cultures of various subpopulations.

Keywords: B cells, antibody-secreting cells (ASCs), germinal center (GC) B cells, human lymphocytes cultures *in vitro*, 3T3-hCD40L

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 24-15-00545).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to E. Zakatina for assistance in manuscript editing.

Author contribution: Grigороva IL — study design, concept of the article, editing, approval of the final version of the article; Sokolova SR — experimental procedure, processing of the results, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 240 date 23 May 2024). All subjects signed the informed consent for participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina L. Grigороva
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; grig76@gmail.com

Received: 26.09.2025 **Accepted:** 10.10.2025 **Published online:** 30.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.053

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-клетки и продуцируемые ими антитела обеспечивают эффективный иммунный ответ на патогены и вакцины. В процессе антиген-зависимой дифференцировки наивные В-клетки дают начало антитело-секретирующим клеткам (АСК) и клеткам памяти [1]. Помимо обеспечения гуморального иммунного ответа В-клетки могут выступать в качестве антиген-презентирующих клеток (АПК) [2]. При связывании антигена с В-клеточным рецептором (ВКР) комплекс интернализуется, и процессированные пептиды представляются на поверхности клетки в комплексе с МНСII для дальнейшего взаимодействия с CD4⁺-Т-хелперами (Th) [3]. Ключевые сигналы, которые получают В-клетки в процессе клеточной кооперации с Th, включают в себя CD40-CD40L взаимодействие, а также секретируемые цитокины IL-21 и IL-4 [4]. Получившие Т-клеточную помощь В-клетки пролиферируют и могут дифференцироваться в короткоживущие АСК или В-клетки герминативных центров (ГЦ), для которых ключевым транскрипционным фактором является Bcl6 [5, 6].

Уникальные свойства В-клеток положили начало разработке методик для их культивации *in vitro* с целью использования для различных прикладных задач: получения АПК с дальнейшим анализом антиген-специфичного Т-клеточного ответа, генерации АСК для производства антител [7, 8], создания клеточных моделей для изучения биологии лимфом [9]. Во многих работах оценивали влияние CD40L и его уровня, цитокинов, продуцируемых Т-клетками, а также цитокинов, секретируемых микроокружением внутри ГЦ, например BAFF, на В-клеточные культуры с целью изучения экспансии В-клеток и образования АСК [10–12]. Однако исследования образования Bcl6⁺-В-клеток ГЦ в культурах из человеческих В-клеток были ограниченными. Цель данной работы — подобрать оптимальные условия для экспансии В-клеток, а также для эффективной генерации АСК и/или В-клеток ГЦ *in vitro*.

В нашем исследовании был проведен анализ культур, полученных из наивных В-клеток и CD27⁺-В-клеток памяти из периферической крови человека под влиянием Т-клеточных сигналов (CD40L, IL-21, IL-4), BAFF и дополнительных компонентов среды, а также проведена оценка экспансии В-клеток и накопления АСК и Bcl6⁺-В-клеток ГЦ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн плазмиды pcDNA-hCD40LG

Последовательность гена человеческого CD40LG (NM_000074.3) была получена с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) из тотальной кДНК мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови человека с использованием прямого 5'-ATATGGATCCGC CACCATGATCGAAACATACAACCA-3' и обратного 5'- ATAT GAATTCACACTGTTTCAGAGTTTGAGTAAGCC-3' праймеров. В последовательности праймеров были включены сайты рестрикции BamHI и EcoRI на 5' и 3'-концах гена CD40LG соответственно, а также последовательность Козак (GCCACCATG) на 5'-конце гена. После обработки полученного ПЦР-продукта и вектора pcDNA3.1+ (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № V79020) эндонуклеазами рестрикции BamHI-HF и EcoRI-HF (New England Biolabs, США, кат. № R3136 и № R3101) было проведено их лигирование с использованием набора Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, США, кат. № M2200) с последующей

трансформацией *E. coli* штамм NEB Stable (New England Biolabs, США, кат. № C3040N). Очистку и выделение плазмиды для дальнейшей трансфекции производили с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген», Россия, кат. № BC221).

Получение фидерной линии мышинных фибробластов, экспрессирующих человеческий CD40L (3T3-hCD40L)

Фидерная линия 3T3-hCD40L была получена на основе клеточной линии мышинных фибробластов NIH 3T3 из коллекции клеточных культур Института вирусологии имени Д. И. Ивановского. Культивирование NIH 3T3 клеток производили в среде DMEM («ПанЭко», Россия, кат. № C415п) с добавлением 10% бычьей фетальной сыворотки (FBS, STEMCELL Technologies, Канада, кат. № 06472), 1× смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина («ПанЭко», Россия, кат. № A065п). Пассирование клеток осуществляли каждые 3–4 дня. Для получения клонов NIH 3T3, стабильно экспрессирующих hCD40L, клетки трансфецировали плазмидой pcDNA-hCD40LG с использованием реагента Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № L3000015) согласно инструкции с последующей селекцией клонов на среде DMEM с добавлением генетицина G418 (0,5 мг/мл; Thermo Fisher Scientific, США, кат. № 10131027). Получение моноклональной линии производили методом предельных разведений. Экспрессию CD40L оценивали методом проточной цитометрии с использованием анти-CD154-FITC-антител (1 : 20; клон TRAP1, BD Bioscience, США, кат. № 561721). В работе использовали моноклональную линию с самым высоким уровнем экспрессии CD40L (рис. 1А).

Выделение МНК из периферической крови здоровых доноров

Исследование проводили в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации 2013 г. Критерии исключения пациентов: наличие инфекционного заболевания в острой фазе; наличие аутоиммунных, хронических заболеваний. Периферическую кровь здоровых доноров отбирали в вакуумные пробирки, содержащие КЗЭДТА в качестве антикоагулянта. Всего в исследовании приняли участие четыре донора, не связанные генетическим родством, возрастом от 21 до 65 лет (медиана — 39 лет). Соотношение мужчин и женщин — 1 : 1. Выделение МНК производили на градиенте фиколла («ПанЭко», Россия, кат. № P050E) в соответствии с протоколом [13]. Полученные клетки в охлажденном буфере для сортировки клеток (0,5% FBS в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS)). Подсчет клеток осуществляли на счетчике CytoSMART Cell Counter (Corning, США) с использованием трипанового синего. Выживаемость клеток была > 95%.

Окрашивание В-клеток для анализа на проточном цитофлуориметре (FACS)

Анализ В-клеток проводили методом проточной цитометрии с использованием антител к поверхностным клеточным маркерам CD19, CD27, CD38, CD95 (Fas), а также внутриклеточному транскрипционному фактору Bcl6. Окрашивание и хранение клеток производили при +4 °С. Для сортировки всех В-клеток (CD3⁺CD19⁺CD20⁺) 20 × 10⁶ МНК предварительно инкубировали в блокирующем растворе с добавлением 10 мкг/мл Human Fc-block (клон K112-91, BD

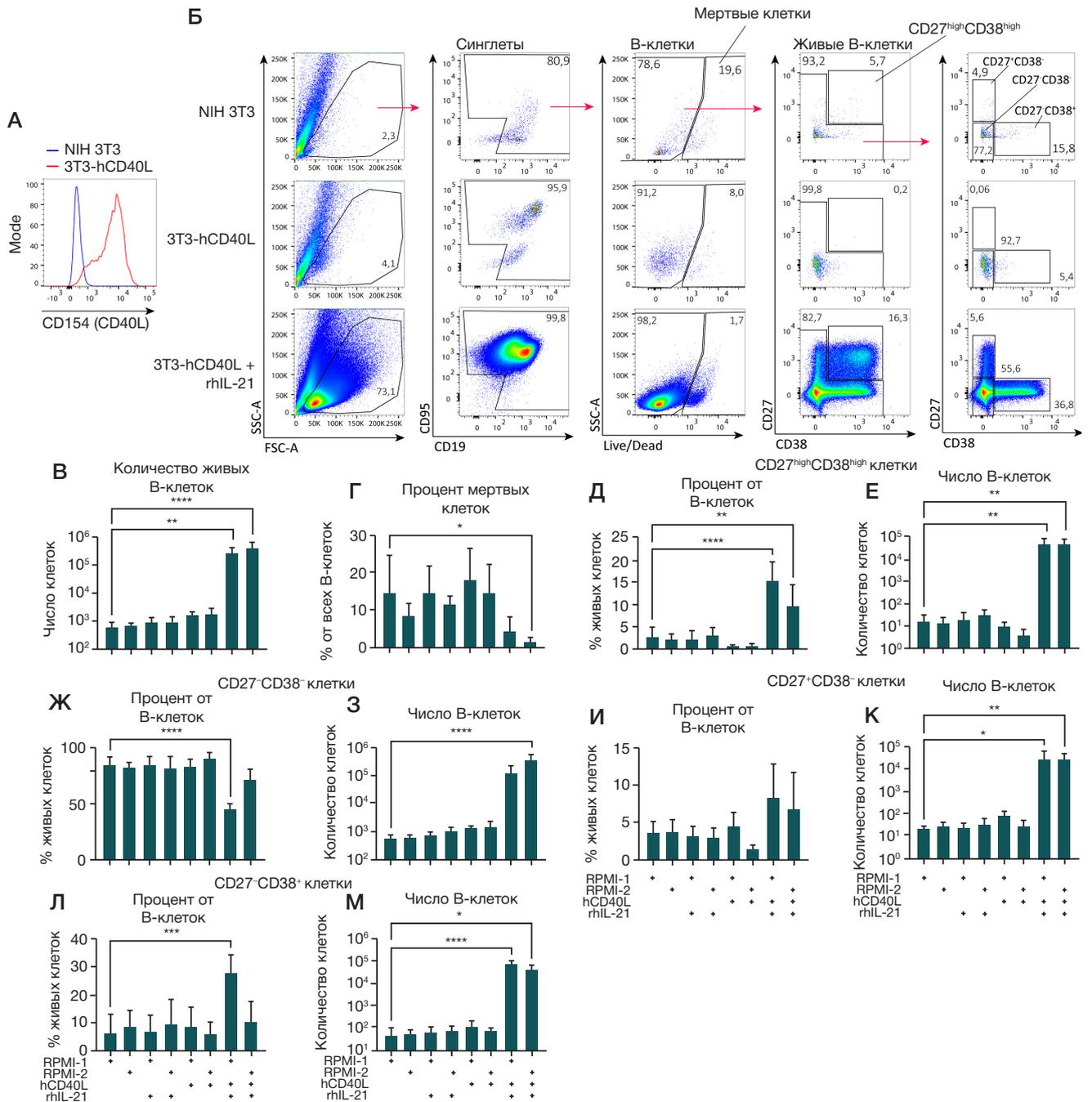


Рис. 1. Анализ влияния фидерной линии, экспрессирующей rhCD40L, цитокина IL-21 и состава культуральной среды на рост культуры В-клеток. Фидерная линия 3T3-hCD40L была получена путем трансфекции линии мышечных фибробластов NIH 3T3 плазмидой pcDNA3.1-hCD40L с получением клеточной линии, стабильно экспрессирующей трансген, и последующим отбором моноклона с наивысшим уровнем hCD40L. $1,5 \times 10^4$ (CD19⁺ CD20⁻) В-клеток, полученных в результате флуоресцентного сортирования из МНК периферической крови человека, культивировали на фидерной линии 3T3-hCD40L с/без добавления rhIL-21 (50 нг/мл) в двух различных по составу культуральных средах (RPMI-1 и RPMI-2) в течение 7 дней. Сравнение проводили относительно В-клеток, культивируемых в присутствии нетрансфицированной фидерной линии NIH 3T3. Анализ В-клеточных культур проводили методом проточной цитометрии. **А.** Гистограмма распределения уровня экспрессии hCD40L (CD154) на поверхности фидерных клеток 3T3-hCD40L (отмечена красной линией) в сравнении с контрольными нетрансфицированными фибробластами NIH 3T3 (отмечена синей линией). **Б.** Репрезентативные графики цитометрического анализа. Стратегия гейтирования указана стрелками. **В, Г.** Количество живых В-клеток (**В**) и процент мертвых В-клеток (**Г**) в культурах. **Д-М.** Количественный анализ процентного содержания среди живых В-клеток и общего числа живых В-клеток фенотипически разделенных по поверхностной экспрессии CD27 и CD38 на CD27^{high}CD38^{high}-плазматические клетки и плазмобласты (**Д, Е**), CD27^{high}CD38^{low}-клетки и плазмобласты (**Ж, З**), CD27^{high}CD38^{low}-клетки (**И, К**) и CD27^{high}CD38^{high}-клетки (**Л, М**). На графиках представлены данные в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) для четырех независимых опытов ($n = 4$), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием поправки Даннетта для множественных сравнений, *, **, ***, **** — $p \leq 0,05$; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

Biosciences, США, кат. № 564220) в течение 10 мин на льду, после чего окрашивали смесью антител анти-CD3-R718 (1 : 100, клон SK7; BD Biosciences, США, кат. № 751978), анти-CD19-BV510 (1 : 100, клон SJ25C1; BD Biosciences, США, кат. № 562947), анти-CD20-FITC (1 : 20, клон L27; BD Biosciences, США, кат. № 347673) в течение 30 мин на льду

в темноте. Для сортирования CD3-CD19⁺CD20⁺CD27⁻ наивных В-клеток и CD3-CD19⁺CD20⁺CD27⁺ В-клеток памяти МНК дополнительно окрашивали анти-CD27-PerCP-Cy5.5 (1 : 50, клон М-T271; BioLegend, США, кат. № 356408). После окрашивания клетки ресуспензировали в буфере для сортировки. Для оценки фенотипа В-клеточных

Таблица 1. Схема эксперимента для оптимизации условий культивирования CD19⁺CD20⁺ В-клеток

3Т3	3Т3-hCD40L	3Т3	3Т3-hCD40L	3Т3	3Т3-hCD40L	3Т3	3Т3-hCD40L
RPMI-1		RPMI-2		RPMI-1		RPMI-2	
-				+ IL-21			

Таблица 2. Схема эксперимента для исследования культур из CD20⁺CD27⁻-наивных В-клеток и CD20⁺CD27⁺-В-клеток памяти

3Т3-hCD40L							
RPMI-2 + IL21							
CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁻				CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺			
-	+IL-4	-	+IL-4	-	+IL-4	-	+IL-4
-	-	+BAFF	+BAFF	-	-	+BAFF	+BAFF

культур на 7-й день клеточный супернатант отбирали из лунок без последующей трипсинизации. Отобранные клетки ресуспендировали в блокирующем буфере, после чего окрашивали с использованием следующей смеси антител: анти-CD19-BV510 (1 : 100), анти-CD27-PerCP-Cy5.5 (1 : 50), анти-CD38-APC-R700 (1 : 50, клон HIT2; BD Biosciences, США, кат. № 564979), анти-CD95-PE (1 : 100, клон DX2; BioLegend, США, кат. № 305608). Перед цитометрическим анализом клетки окрашивали с использованием Helix NP Blue в концентрации 25 нМ (Biolegend, США, кат. № 425305) для исключения мертвых клеток. Внутриклеточное окрашивание клеток производили с использованием набора True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (BioLegend, США, кат. № 424401) и антител анти-Bcl-6-AlexaFluor488 (1 : 20, клон: K112-91; BD Biosciences, США, кат. № 561524) в течение 12 ч. При цитометрическом анализе культур определяли следующие субпопуляции: CD19⁺CD27^{high}CD38^{high} (определяемые как АСК), CD19⁺CD38⁺CD27⁻, CD19⁺CD38⁺CD27⁺, CD19⁺CD38⁺CD27⁻ В-клетки, CD19⁺CD95^{high} В-клетки (соответствующие активированным В-клеткам), CD19⁺CD95^{high}Bcl6⁺ В-клетки (определяемые как В-клетки ГЦ). Сортинг В-клеток и цитометрический (FACS)-анализ В-клеточных культур проводили на клеточном сортере BD FACSAria™ III с использованием программного обеспечения FACSDiva™. Для обработки данных использовали FlowJo версии 10.8.1.

Культивирование В-клеток в присутствии клеток фидерной линии

Фибробласты 3Т3-hCD40L или контрольные нетрансфецированные клетки инактивировали в среде DMEM митомицином С (5 мкг/мл; Sigma Aldrich, США, кат. № 50-07-7) в течение 2 ч, отмывали DPBS («ПанЭко», Россия, кат. № P060E) не менее 3 раз и пересаживали на шестилуночный планшет (Wuxi NEST, кат. № 703002) в количестве 3×10^5 кл./лунка. На следующий день добавляли $1,5 \times 10^4$ отсортированных CD19⁺CD20⁺ В-клеток. Культивирование производили в средах: RPMI-1 на основе RPMI-1640 («ПанЭко», Россия, кат. № C330п) с включением 10% FBS, 1× пирувата натрия («ПанЭко», Россия, кат. № Ф023), 1× GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № 35050061), 1× смеси антибиотиков) и RPMI-2 на основе richRPMI (BioinnLabs, кат. № bn-3A3R), содержащую человеческий трансферрин, инсулин, альбумин, а также глутатион и дополнительные микроэлементы и витамины, с включением 10% FBS, 1× GlutaMAX™, 1× антибиотики. Рекombинантный человеческий IL-21 (rhIL-21, SCI-store, Россия, кат. № PSG260) добавляли в среды в концентрации 50 нг/мл. CD20⁺CD27⁻ и CD20⁺CD27⁺ В-клетки культивировали в RPMI-2 с добавлением

IL-21 ± IL-4 (SCI-store, Россия, кат. № PSG040, 10 нг/мл) и ± BAFF (BioLegend, США, кат. № 559604, 100 нг/мл). Культивирование производили в течение 7 дней с обновлением среды на 3-й и 5-й дни. Схемы экспериментов с культивированием всех CD19⁺CD20⁺ В-клеток, а также CD19⁺CD20⁺CD27⁻ наивных и CD19⁺CD20⁺CD27⁺ В-клеток памяти в исследуемых и контрольных условиях представлены в табл. 1 и 2.

Статистический анализ результатов

Независимые опыты, указанные в исследовании, проводили на МНК из крови четверых генетически не связанных взрослых доноров. Статистический анализ был проведен с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версия 9.5.1 (GraphPad Software Inc, США). Применяемые статистические методы указаны в подписях к рисункам. Различия между группами, не имеющие статистической значимости, не отмечены на графиках. Выбросы не исключены.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе работы было установлено, каким образом наличие CD40L, цитокина IL-21 или специализированных добавок в клеточной среде воздействует на выживаемость и экспансию В-клеток, а также образование АСК и В-клеток ГЦ (рис. 1, 2). Для продолжительной кокультурации В-клеток с человеческим CD40L (hCD40L) была получена трансгенная клеточная линия мышиных фибробластов NIH 3Т3, стабильно экспрессирующая hCD40L (3Т3-hCD40L) (рис. 1А).

В-клетки (CD19⁺CD20⁺) были получены из МНК периферической крови человека в результате флуоресцентного сортирования (с чистой популяцией > 99%). $1,5 \times 10^4$ В-клеток культивировали в течение 7 дней в шестилуночном планшете в присутствии фидеров 3Т3-hCD40L, или контрольных нетрансфецированных 3Т3-клеток. Для культивации использовали две среды: стандартную RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, натрия пирувата, глутамин (обозначенная как RPMI-1) или такую же среду, обогащенную добавками из человеческой сыворотки, включая рекомбинантный инсулин, трансферрин, липид-обогащенный альбумин, глутатион, а также дополнительными микроэлементами и витаминами (RPMI-2). IL-21 добавляли в концентрации 50 нг/мл (табл. 1).

Цитометрический анализ полученных В-клеточных культур (рис. 1Б) показал, что при совместном действии hCD40L и IL-21 достигается наибольший уровень экспансии В-клеток (рис. 1В) и увеличивается выживаемость

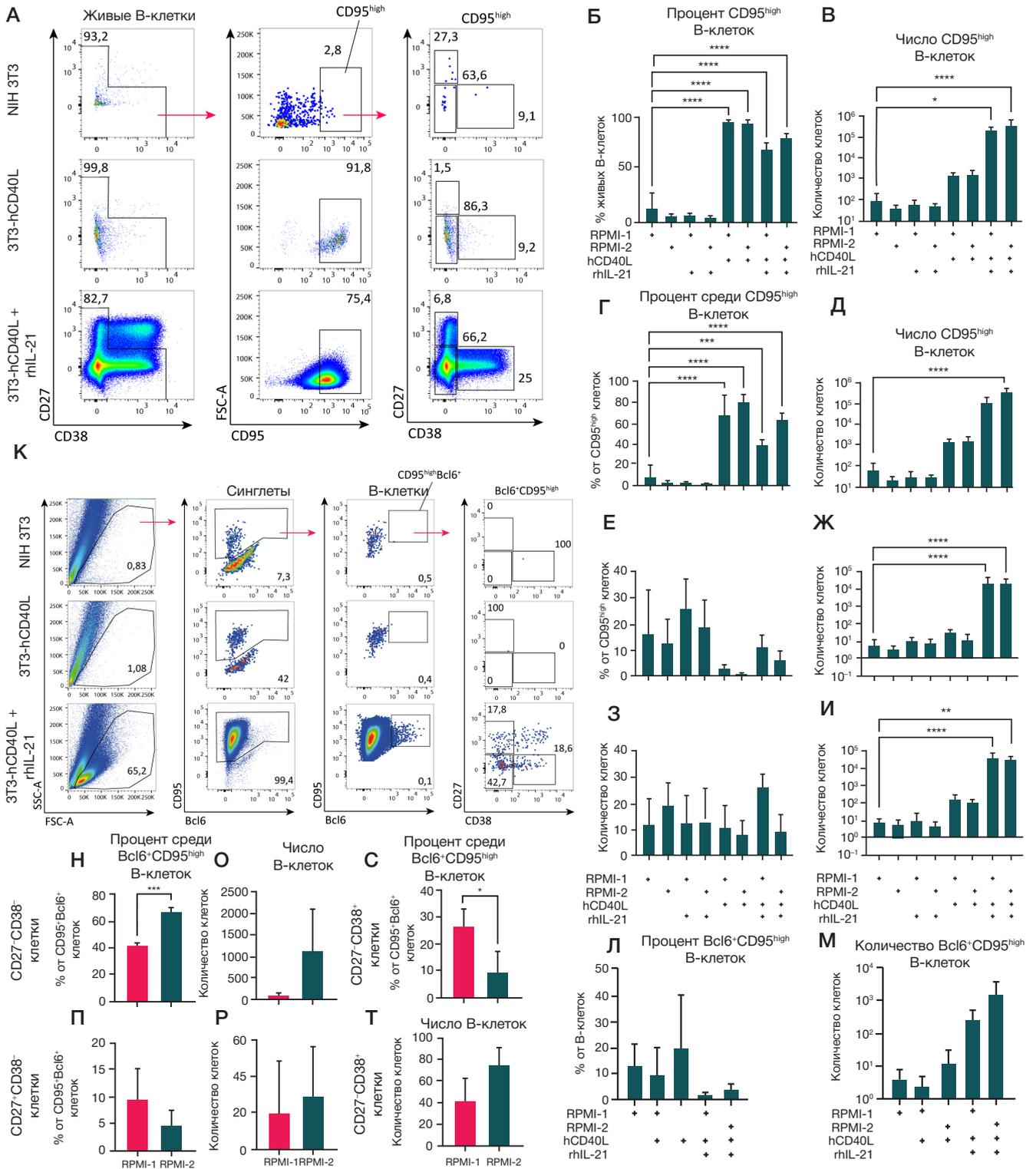


Рис. 2. Анализ влияния CD40L, IL-21 и состава культуральной среды на поверхностную экспрессию CD95 и внутриклеточную экспрессию транскрипционного фактора Bcl6 в В-клеточных культурах. **А-И.** Анализ поверхностной экспрессии CD95 и коэкспрессии CD27 и CD38 на В-клетках в культурах (исключающий CD27^{high}CD38^{high}-плазматические клетки). Репрезентативные графики цитометрического анализа (**А**). Стратегия гейтирования указана стрелками. **Б, В.** Количественный анализ процентного содержания (**Б**) и абсолютного числа (**В**) CD95^{high}-В-клеток в культурах. **Г-И.** Количественный анализ процентного содержания В-клеток и абсолютное число живых CD95^{high}-В-клеток для CD27⁺CD38⁻ (**Г, Д**), CD27⁺CD38⁻ (**Е, Ж**) и CD27⁺CD38⁺ (**З, И**) В-клеток. **К-Т.** Культивированные в присутствии фидерной линии NIH 3Т3, экспрессирующей hCD40L, с/без rhIL-21 (50 нг/мл) в RPMI-1 или RPMI-2 культуры В-клеток были фиксированы и пермеабализированы для окрашивания внутриклеточного транскрипционного фактора Bcl6. Сравнение проводили относительно В-клеток, культивируемых в присутствии нетрансфицированной линии NIH 3Т3. Репрезентативные графики цитометрического анализа фиксированных В-клеток из культур. Стратегия гейтирования указана стрелками (**К**). Количественный анализ процентного содержания (**Л**) и абсолютного числа (**М**) Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток от общего количества В-клеток. Количественный анализ процентного содержания и абсолютного числа CD27⁺CD38⁻ (**Н, О**), CD27⁺CD38⁻ (**П, Р**) и CD27⁺CD38⁻ (**С, Т**) Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток. На графиках представлены данные в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD) для четырех независимых опытов (n = 4), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ субпопуляций CD95^{high}-В-клеток (**Б-И**), а также Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток (**Л, М**) проводили методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием поправки Даннета для множественных сравнений. Статистический анализ субпопуляций Bcl6⁺CD95^{high}-В-клеток (**Н-Т**) проводили методом непарного Т-теста. *, **, ***, **** — p ≤ 0,05; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

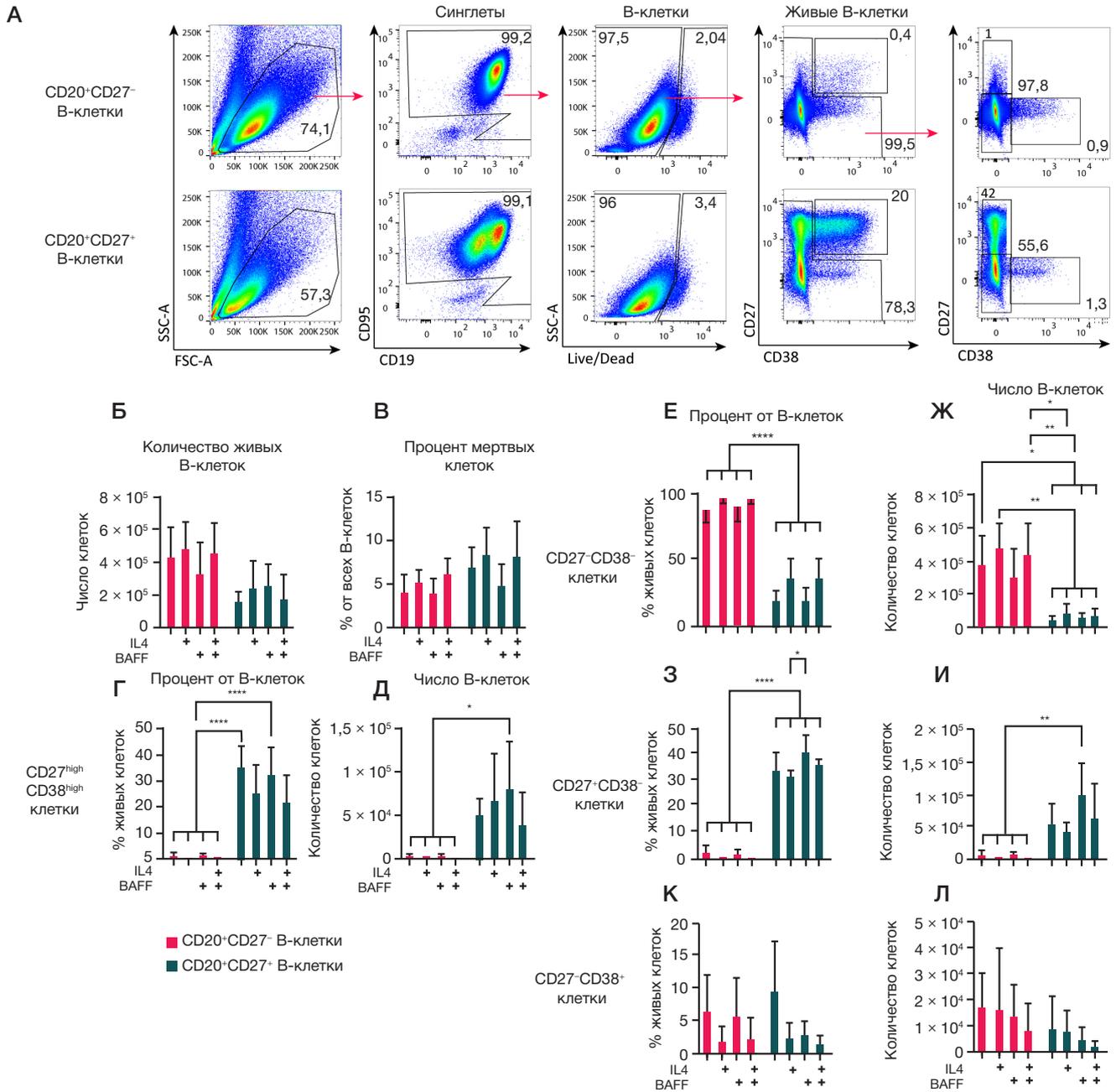


Рис. 3. Анализ влияния различных композиций цитокинов на культуры из CD27⁻ В-клеток и CD27⁺ В-клеток памяти. Преимущественно наивные В-клетки (CD19⁺CD20⁺CD27⁻) и В-клетки памяти (CD19⁺CD20⁺CD27⁺), полученные из МНК крови в результате FACS, в количестве $1,5 \times 10^4$ культивировали на фидерных клетках 3Т3, экспрессирующих hCD40L, в культуральной среде RPMI-2 в присутствии rhIL-21 (50 нг/мл), с/без добавления цитокинов rhIL-4 (10 нг/мл) и rhBAFF (100 нг/мл) в течение 7 дней. Анализ клеточных культур производили методом проточной цитометрии. **А.** Репрезентативные графики цитометрического анализа. Стрелками указана стратегия гейтирования. **Б, В.** Количество живых В-клеток (**Б**) и процент мертвых В-клеток (**В**) в культурах. **Г–Л.** Количественный анализ процентного содержания среди живых В-клеток и абсолютного числа CD27^{high}CD38^{high}-плазматических клеток и плазмабластов (**Г, Д**), CD27⁻CD38⁺ (**Е, Ж**), CD27⁻CD38⁻ (**З, И**) и CD27⁺CD38⁺ (**К, Л**) В-клеток. На графиках представлены данные в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) для четырех независимых опытов ($n = 4$), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия Тьюки для множественных сравнений, *, **, ****, ***** — $p \leq 0,05$; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

В-клеток, особенно при включении в среду добавок в виде рекомбинантных белков из человеческой сыворотки (рис. 1Г).

В культурах с hCD40L и IL-21 также наблюдается наибольшее накопление CD27^{high}CD38^{high} АСК (рис. 1Д, Е), повышение числа (но не процентного содержания) CD27⁻CD38⁺-В-клеток (рис. 1Ж, З) и накопление CD27⁺- и CD38⁺-В-клеток (рис. 1И–М), причем при культивировании в RPMI-1 процент CD27⁺CD38⁺-В-клеток был заметно выше (рис. 1Л).

В-клетки ГЦ характеризуются повышенной поверхностной экспрессией CD95 (Fas) и присутствием внутриклеточного

транскрипционного фактора Bcl6 [5]. Экспрессия CD95 также повышается на активированных В-клетках [15]. Исходя из этого, мы оценили экспрессию CD95 на поверхности В-клеток в культуре как маркера клеточной активации (рис. 2А).

Анализ полученных данных показал, что в присутствии 3Т3-hCD40L-клеток до 97% В-клеток в культуре повышают поверхностную экспрессию CD95 (рис. 2А–В), а добавление IL-21 заметно не влияет на процент CD95^{high}-В-клеток (рис. 2Б). При этом до 80% всех CD95^{high}-В-клеток имеют фенотип CD27⁻CD38⁺ (рис. 2Г, Д).

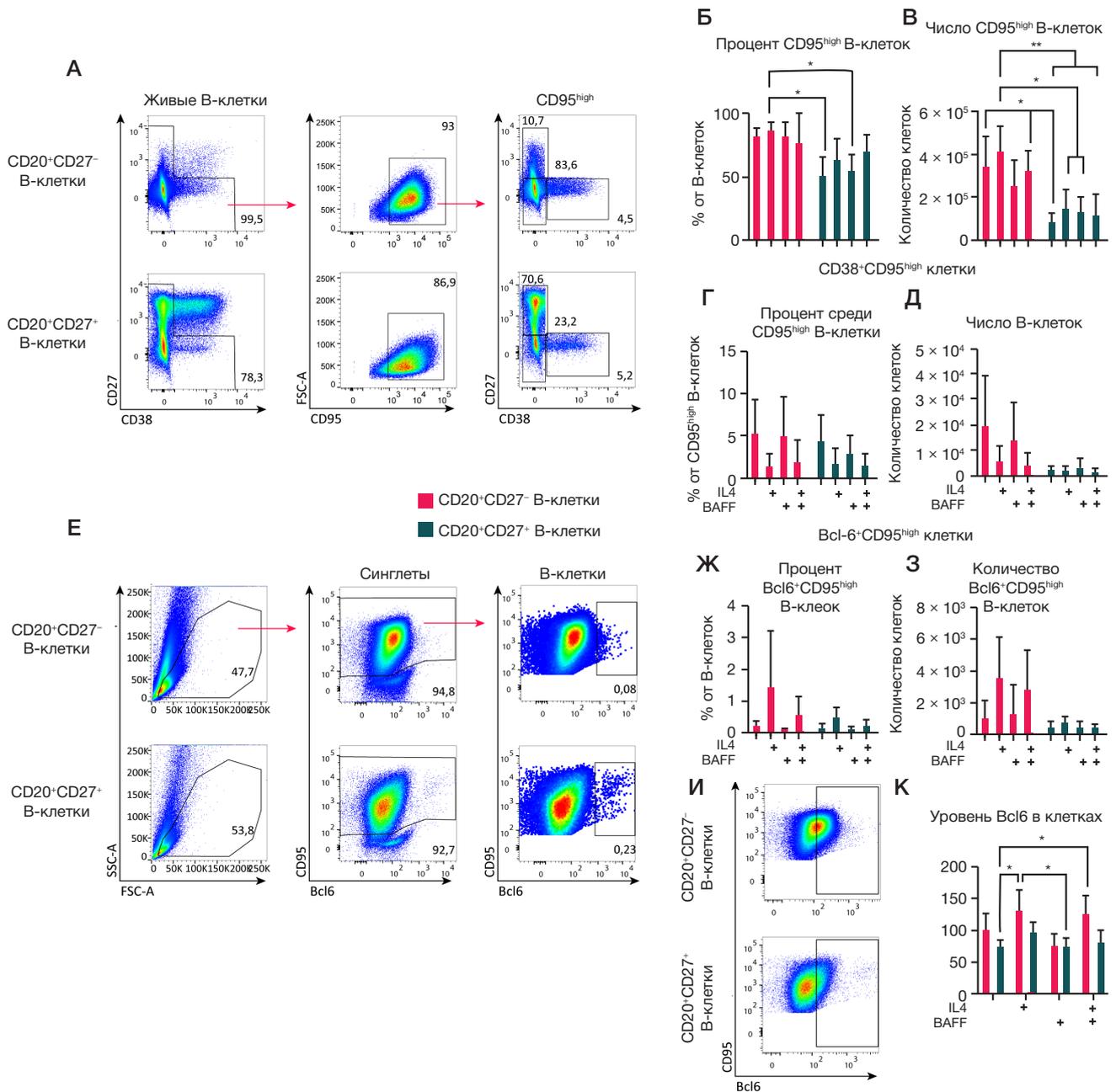


Рис. 4. Анализ влияния различных композиций цитокинов на поверхностную экспрессию CD95 и внутриклеточную экспрессию транскрипционного фактора Bcl6 на культуры из CD27⁻ В-клеток и CD27⁺ В-клеток памяти. $1,5 \times 10^4$ CD19⁺CD20⁺CD27⁻ и CD19⁺CD20⁺CD27⁺ В-клеток культивировали на фидерных клетках 3Т3, экспрессирующих hCD40L, в культуральной среде RPMI-2 в присутствии rhIL-21 (50 нг/мл), с/без добавления цитокинов rhIL-4 (10 нг/мл) и rhBAFF (100 нг/мл) в течение 7 дней. **А–Д.** Анализ поверхностной экспрессии CD95 и коэкспрессии CD27 и CD38 на В-клетках в культурах (исключая CD27^{high}CD38^{high}-плазматические клетки). **А.** Репрезентативные графики цитометрического анализа поверхностной экспрессии CD95. Стратегия гейтирования указана стрелками. **Б, В.** Количественный анализ процентного содержания среди живых В-клеток (**Б**) и абсолютное число (**В**) живых CD95^{high}-В-клеток в культурах. **Г, Д.** Количественный анализ процентного содержания среди CD95^{high}-В-клеток (**Г**) и абсолютное число живых CD38⁺CD95^{high}-В-клеток (**Д**). **Е–К.** Анализ внутриклеточной экспрессии Bcl6 в клеточных культурах. Для этого клетки из культур были фиксированы и пермеабелизованы для окрашивания внутриклеточного транскрипционного фактора Bcl6. Репрезентативные графики цитометрического анализа (**Е**). Стратегия гейтирования указана стрелками. Процентное содержание (**Ж**) от В-клеток и абсолютное число (**З**) CD95^{high}Bcl6⁺-клеток. Репрезентативные панели цитометрического анализа, иллюстрирующие распределение по Bcl6 в клеточных культурах из CD20⁺CD27⁺ и CD20⁺CD27⁻ В-клеток (**И**). Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) транскрипционного фактора Bcl6 в клетках из культур (**К**). Данные количественных анализов представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) для четырех независимых опытов ($n = 4$), каждый опыт выполнен в двух репликах. Статистический анализ проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием критерия Тьюки для множественных сравнений, *, **, ***, **** — $p \leq 0,05$; 0,001; 0,0001; 0,0001 соответственно

Число CD27⁺CD38⁻CD95^{high} и CD27⁻CD38⁺CD95^{high} В-клеток в культурах возрастает при совместном добавлении hCD40L и IL-21 (рис. 2Ж, И), при этом их доля не изменяется (рис. 2Е, 3).

Для оценки накопления CD95^{high} Bcl6⁺ (ГЦ-подобных) В-клеток проводили фиксацию поверхностно окрашенных В-клеток с последующим внутриклеточным окрашиванием

антителами к Bcl6 (рис. 2К). Количественный анализ показал низкую представленность данной субпопуляции В-клеток в культурах (< 2%) (рис. 2Л). Наиболее заметное накопление ГЦ-подобных В-клеток наблюдалось в культуре RPMI-2 с включением 3Т3-hCD40L фидеров и IL21 (рис. 2М). Надо отметить, что в среде RPMI-2 более 50% ГЦ-подобных В-клеток имели фенотип CD27⁻CD38⁺, что достоверно

выше, чем в культурах с RPMI-1 (рис. 2Н, О). CD27⁺CD38⁻CD95^{high} Vcl6⁺ В-клетки встречались в культурах с RPMI-1 и RPMI-2 в равной степени (рис. 2П, Р), а доля CD27⁻CD38⁺ ГЦ-подобных клеток была достоверно повышена в культурах с RPMI-1 (рис. 2С, Т).

Таким образом, кокультивирование В-клеток с 3Т3-hCD40L фидерами и IL-21 позволяет достигнуть наибольшей экспансии и выживаемости В-клеток. При данных условиях на 7-й день культивирования в RPMI-1 около 15% среди живых клеток составляют АСК и 0,2% ГЦ-подобные В-клетки, а в RPMI-2 — 10 и 0,4% соответственно. Поэтому для дальнейшей работы была выбрана среда RPMI-2 как наиболее композиционно богатая для В-клеток.

В следующей серии экспериментов мы исследовали влияние различных композиций цитокинов (IL-4, BAFF) на клеточные культуры из CD20⁺CD27⁻В-клеток, которые преимущественно представлены наивными В-клетками, и CD20⁺CD27⁺В-клеток памяти. Отдельные субпопуляции В-клеток были получены из МНК периферической крови в результате флуоресцентного сортирования (с чистотой популяций > 95%). 1,5 × 10⁴ В-клеток культивировали в среде RPMI-2 в присутствии 3Т3-hCD40L-клеток с добавлением IL-21 (50 нг/мл) и цитокинов IL-4 (10 нг/мл) и/или BAFF (100 нг/мл) (табл. 2).

Цитометрический анализ клеточных культур на 7-й день (рис. 3А) показал, что различные композиции цитокинов не оказывают существенного влияния на экспансию и выживаемость В-клеток (рис. 3Б, В). Для всех комбинаций цитокинов наблюдалась тенденция к повышенной экспансии и сниженной доли мертвых В-клеток в культурах из CD27⁻ наивных В-клеток по сравнению с CD27⁺В-клетками памяти.

Важно отметить, что в культурах из CD27⁺В-клеток памяти происходит выраженное накопление CD27^{high}CD38^{high} АСК (20–35% от всех В-клеток) (рис. 3Г, Д). В культурах из преимущественно наивных CD27⁻В-клеток доля АСК была менее 2% (рис. 3Г, Д), в то время как доля CD27⁻CD38⁻В-клеток (рис. 3 Е, Ж) была достоверно выше по сравнению с культурами из CD27⁺В-клеток. CD27⁺CD38⁻В-клетки были обогащены в культурах клеток памяти, а CD27⁻CD38⁺В-клетки присутствовали при всех условиях без выраженных различий (рис. 3З–Л). Вне зависимости от исходной популяции в культурах наблюдался тренд на снижение доли АСК, CD27⁺CD38⁻ и CD27⁻CD38⁺клеток при добавлении IL-4 (рис. 3Г, Д, 3–Л).

Вне зависимости от условий и стартовых клеток, большинство клеток имеет фенотип CD95^{high}. При этом доля и число CD95^{high} В-клеток несколько повышены в культурах из CD27⁻наивных В-клеток (рис. 4А–В). Интересно также отметить тенденцию к снижению субпопуляции CD27⁻CD38⁺CD95^{high}В-клеток для всех условий при добавлении IL-4 (рис. 4Г, Д).

Анализ количества и доли CD95^{high}Vcl6⁺В-клеток (рис. 4Е) в культурах из исходных CD27⁻ — и CD27⁺В-клеток не выявил статистически значимых различий (рис. 4Ж, З). Однако при добавлении IL-4 наблюдался тренд на повышение доли ГЦ-подобных В-клеток, который был более выражен для CD27⁻В-клеток. Интересно также отметить тенденцию на повышение уровня Vcl6 в В-клеточных культурах из CD27⁻ по сравнению с CD27⁺В-клетками, которая соблюдалась для всех условий, кроме добавления BAFF без IL-4 (рис. 4И, К).

Таким образом, при культивации в среде RPMI-2 с 3Т3-hCD40L-фидерами и IL-21 наблюдалась значимо

большая экспансия клеточной культуры из наивных CD27⁻В-клеток с минимальным накоплением АСК по сравнению с культурами из CD27⁺В-клеток памяти, в которых АСК достигали 30%. Статистически значимых различий в накоплении ГЦ-подобных В-клеток выявлено не было. Добавление BAFF существенного эффекта на В-клеточные культуры не оказывало, в то время как IL-4 вызывал небольшое снижение доли АСК и увеличение ГЦ-подобных В-клеток, особенно в CD27⁻В-клеточных культурах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культивирование человеческих В-клеток *in vitro* имеет фундаментальное значение для решения широкого спектра биотехнологических задач. К ним относятся получение АСК для производства антител, использование В-клеток в качестве антиген-презентирующих клеток для активации Т-клеток, а также тестирование разрабатываемых трансгенных продуктов для иммунотерапии [16]. Несмотря на многочисленные исследования условий культивирования В-клеток [11–13], создание эффективных протоколов для отдельных прикладных задач остается актуальным.

В настоящем исследовании была поставлена цель подобрать комбинацию оптимальных факторов для: а) эффективной экспансии В-клеток в клеточной культуре; б) максимального накопления популяции АСК; в) Vcl6-экспрессирующих В-клеток, подобных В-клеткам ГЦ. Для этого был проведен комплексный анализ влияния исходного статуса В-клеток по маркеру CD27 (субпопуляции CD27⁻ и CD27⁺), комбинации белков и добавок, замещающих человеческую сыворотку, цитокина BAFF, критического для выживания В-клеток, а также стимулов, имитирующих Т-клеточную помощь (CD40L, IL-21, IL-4), на эффективность протоколов культивирования.

Экспансия и поддержание жизнеспособности активированных В-клеток

Цитометрический анализ культур В-клеток на 7-й день кокультивирования продемонстрировал, что наивысшие показатели экспансии и выживаемости были достигнуты в условиях использования трансгенной фидерной линии, экспрессирующей человеческий hCD40L, в комбинации с цитокином IL-21. Эти данные согласуются с результатами, описанными ранее [17, 18]. В то же время добавление в культуру цитокинов IL-4 и BAFF в концентрациях 10 и 100 нг/мл соответственно не оказало статистически значимого влияния на пролиферацию или жизнеспособность клеток.

Оптимизация состава питательной среды показала, что включение в базовую среду, содержащую 10% FBS, коктейля из рекомбинантного человеческого инсулина, трансферрина и альбумина способствовало максимальному снижению доли мертвых клеток.

Согласно сравнительному анализу, культуры, инициированные из CD27⁻В-клеток, в среднем в 1,5 раза превосходили по численности культуры, полученные из CD27⁺клеток, а также характеризовались более низким процентом гибели клеток, что подтверждается литературными данными [19].

Таким образом, для оптимальной экспансии и поддержания жизнеспособности активированных В-клеток *in vitro* целесообразно использовать в качестве исходной популяции CD27⁻клетки. Наиболее эффективный протокол включает их кокультивирование с фидерными клетками,

экспрессирующими hCD40L, в среде, обогащенной IL-21, с добавлением комбинации сывороточных белков (включая инсулин, трансферрин, альбумин).

Накопление АСК в В-клеточных культурах

Следующей задачей было определение условий культивирования, при которых происходит накопление CD27^{high}CD38^{high} АСК в В-клеточных культурах. Было показано, что при одновременном присутствии hCD40L и IL-21 в культурах накапливались CD27^{high}CD38^{high}-клетки, достигая 10–15% от всего клеточного пула. Это согласуется с результатами ранее опубликованных работ [20, 21, 22]. Введение в среду для культивирования рекомбинантных сывороточных белков приводило к снижению доли АСК в культурах.

Выраженное накопление CD27^{high}CD38^{high}-В-клеток отмечалось в культурах из CD27⁺-В-клеток памяти (20–35% от всех живых клеток), что согласуется с более ранними исследованиями [21, 23] и быстрым вовлечением В-клеток памяти в АСК-ответ при повторном контакте с антигеном и получением Т-клеточной помощи [24]. В отличие от клеток памяти, в культурах из преимущественно наивных CD27⁻-В-клеток доля и количество АСК были заметно снижены (1–2% от общего числа клеток).

Отмечалось также, что в присутствии цитокина BAFF количество CD27^{high}CD38^{high}, а также CD27⁺CD38⁻-В-клеток в культурах из CD27⁺-В-клеток памяти было максимальным, что согласуется с другими данными [25, 26]. При добавлении IL-4, наоборот, отмечался тренд на снижение доли и числа АСК и CD27⁺CD38⁻-клеток и повышение доли CD27⁻CD38⁻-В-клеток.

Из полученных нами результатов следует, что для обогащения АСК в В-клеточной культуре предпочтительнее использовать CD27⁺-В-клетки памяти в комбинации с hCD40L и IL-21 и с добавлением BAFF. Надо отметить, что данный анализ проводили без учета уровня секреции антител АСК, которая может существенно варьироваться в зависимости от уровня созревания АСК и множества дополнительных факторов, и требует отдельных исследований для оптимизации продукции антител в клеточных культурах.

Накопление В-клеток ГЦ в клеточных культурах

Как было упомянуто ранее, сигнал через ВКР, а также «помощь» Th-клеток в виде CD40L и секреции IL-21 индуцирует появление В-клеток ГЦ. Ключевым маркером В-клеток ГЦ является экспрессия транскрипционного фактора Bcl6 [5]. Фенотипический анализ лимфоцитов из вторичных лимфоидных органов человека позволил идентифицировать CD95^{high}Bcl6⁺CD38⁺CD27^{+/}-В-клетки как В-клетки ГЦ [27]. В своей работе нам удалось идентифицировать ГЦ-подобные В-клетки в культурах по комбинации поверхностного маркера CD95 и внутриклеточного транскрипционного фактора Bcl6.

Накопление CD95^{high} Bcl6⁺-В-клеток имело место в культурах с hCD40L и IL-21 в соответствии с исследованиями *in vivo* [28]. Исходные клеточные популяции CD27⁻ и CD27⁺-В-клеток не оказывали значимого влияния на долю и число

CD95^{high}Bcl6⁺ в конечных В-клеточных культурах. Однако в культурах из CD27⁻-В-клеток был обнаружен тренд на повышение уровня Bcl6. Добавление рекомбинантных сывороточных белков и IL4 способствовало увеличению доли ГЦ-подобных В-клеток и снижению АСК. Это согласуется с результатами исследований, показавшими, что совместное действие IL-21 и IL-4, секретируемых Th, повышает и стабилизирует экспрессию Bcl6 в активированных В-клетках [29], способствуя их дифференцировке в В-клетки ГЦ [5]. При этом Bcl6 является антагонистом транскрипционного фактора Blimp-1 и ингибирует дальнейшее дифференцирование В-клеток в АСК [24].

Таким образом, нам удалось показать, что культивирование В-клеток в присутствии hCD40L и IL-21 позволяет также наблюдать образование ГЦ-подобных В-клеток по повышению экспрессии Bcl6. При этом немного большее накопление ГЦ-подобных В-клеток наблюдается в культуре из CD27⁻-наивных В-клеток при включении в среду IL-4 и добавок, заменяющих человеческую сыворотку.

Однако надо отметить, что все используемые в данной работе компоненты не приводят к накоплению более 1% ГЦ-подобных В-клеток. В-клетки ГЦ отличаются высокой чувствительностью к апоптозу в отсутствии поддержки со стороны фолликулярных Th и особых клеток — фолликулярных дендритных клеток (ФДК) [30]. Показано, что использование клеточных линий на основе ФДК может быть более предпочтительным для культивирования В-клеток ГЦ [10]. Исходя из полученных нами данных и результатов ранее выполненных исследований, мы предполагаем, что направленное поддержание культур В-клеток ГЦ *in vitro* требует использования более сложных систем кокультивирования с включением ФДК-подобных В-клеточных линий.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволило подобрать оптимальные условия для эффективной экспансии В-клеток из периферической крови человека *in vitro*, а также для получения культуры, обогащенной АСК. Как было показано, включение в культуры hCD40L-экспрессирующих клеток фидеров и IL-21 необходимо как для пролиферации и выживаемости, так и для дифференцировки В-клеток *in vitro*. Для оптимальной экспансии В-клеточной культуры предпочтительно использовать CD27⁻-наивные В-клетки и среду с добавлением комбинации человеческих сывороточных белков (включая инсулин, трансферрин, альбумин). В то же время использование CD27⁺-В-клеток памяти и добавление BAFF в среду предпочтительны для обогащения АСК. В проведенном исследовании нам удалось произвести оценку накопления CD95^{high}Bcl6⁺ ГЦ-подобных В-клеток. Однако используемой в работе комбинации условий оказалось недостаточно для существенного обогащения культур данными клетками. Предположительно, получение культуры ГЦ-подобных В-клеток из В-клеток периферической крови может потребовать использования ФДК-подобных фидерных клеток и дополнительных растворимых факторов.

Литература

- Elsner RA, Shlomchik MJ. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*. 2020; 53 (6): 1136–50.
- Ghosh D, Jiang W, Mukhopadhyay D, Mellins ED. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Current Opinion in Immunology*. 2021; 70: 129–37.
- Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol*. 2022; 13: 954936.
- Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. 2014; 345 (6200): 1058–62.
- Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, Waard R de, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997; 16 (2): 161–70.
- Duy C, Yu JJ, Nahar R, Swaminathan S, Kweon SM, Polo JM, et al. BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *J Exp Med*. 2010; 207 (6): 1209–21.
- Wong R, Bhattacharya D. Basics of memory Bcell responses: lessons from and for the real world. *Immunology*. 2019; 156 (2): 120.
- Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol*. 2021; 42 (12): 1143–58.
- Arpin C, Déchanet J, Kooten CV, Merville P, Grouard G, Brière F, et al. Generation of Memory B Cells and Plasma Cells in Vitro. *Science*. 1995; 268: 720–2.
- Caesar R, Di Re M, Krupka JA, Gao J, Lara-Chica M, Dias JML, et al. Genetic modification of primary human B cells to model high-grade lymphoma. *Nat Commun*. 2019; 10 (1): 4543.
- Rovsing AB, Green K, Jensen L, Nielsen IH, Mikkelsen JG, Degn SE. Multiparametric Optimization of Human Primary B-Cell Cultures Using Design of Experiments. *Scand J Immunol*. 2025; 102 (2): e70043.
- Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*. 2003; 112 (2): 286–97.
- Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*. 2004; 113 (7): 1069.
- Butov KR, Osipova EY, Mikhalkin NB, Trubina NM, P anteelev MA, Machlus KR. In vitro megakaryocyte culture from human bone marrow aspirates as a research and diagnostic tool. *Platelets*. 2021; 32 (7): 928–35.
- Schattner EJ, Elkon KB, Yoo DH, Tumang J, Krammer PH, Crow MK, Friedman SM. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med*. 1995; 182 (5): 1557–65. DOI: 10.1084/jem.182.5.1557.
- Verstegen NJ, Pollastro S, Unger PPA, Marsman C, Elias G, Jorritsma T, et al. Single-cell analysis reveals dynamics of human B cell differentiation and identifies novel B and antibody-secreting cell intermediates. *eLife*. 2023; 12: e83578.
- Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. *J Immunol*. 2006; 177 (8): 5236–47.
- Бязрова М. Г, Астахова Е. А., Спиридонова А. Б., Васильева Ю. В., Прилипов А. Г, Филатов А. В. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. *Иммунология*. 2020; 41 (6): 501–10.
- Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*. 2003; 171 (9): 4621–9.
- Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *J Immunol*. 2013; 190 (4): 1827–36.
- Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol*. 2005; 175 (12): 7867–79.
- Unger PA, Verstegen NJM, Marsman C, Jorritsma T, Rispens T, Ten Brinke A, van Ham SM. Minimalistic In Vitro Culture to Drive Human Naive B Cell Differentiation into Antibody-Secreting Cells. *Cells*. 2021; 10 (5): 1183.
- Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013; 210 (12): 2739–53.
- Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol Rev*. 2019; 288 (1): 64–74.
- Robinson MJ, Pitt C, Brodie EJ, Valk AM, O'Donnell K, Nitschke L, et al. BAFF, IL-4 and IL-21 separately program germinal center-like phenotype acquisition, BCL6 expression, proliferation and survival of CD40L-activated B cells in vitro. *Immunol Cell Biol*. 2019; 97 (9): 826–39.
- Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest*. 2003; 112 (2): 286–97.
- Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol*. 2001; 167 (7): 3610–8.
- Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med*. 2010; 207 (2): 353–63.
- Chevrier S, Kratina T, Emslie D, Tarlinton DM, Corcoran LM. IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. *Immunol Cell Biol*. 2017; 95 (10): 925–32.
- Krimpenfort LT, Degn SE, Heesters BA. The follicular dendritic cell: At the germinal center of autoimmunity? *Cell Reports*. 2024; 43 (3): 113869.

References

- Elsner RA, Shlomchik MJ. Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity. *Immunity*. 2020; 53 (6): 1136–50.
- Ghosh D, Jiang W, Mukhopadhyay D, Mellins ED. New insights into B cells as antigen presenting cells. *Current Opinion in Immunology*. 2021; 70: 129–37.
- Rastogi I, Jeon D, Moseman JE, Muralidhar A, Potluri HK, McNeel DG. Role of B cells as antigen presenting cells. *Front Immunol*. 2022; 13: 954936.
- Shulman Z, Gitlin AD, Weinstein JS, Lainez B, Esplugues E, Flavell RA, et al. Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection. *Science*. 2014; 345 (6200): 1058–62.
- Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, Waard R de, et al. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997; 16 (2): 161–70.
- Duy C, Yu JJ, Nahar R, Swaminathan S, Kweon SM, Polo JM, et al. BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *J Exp Med*. 2010; 207 (6): 1209–21.
- Wong R, Bhattacharya D. Basics of memory Bcell responses: lessons from and for the real world. *Immunology*. 2019; 156 (2): 120.
- Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol*. 2021; 42 (12): 1143–58.
- Arpin C, Déchanet J, Kooten CV, Merville P, Grouard G, Brière F, et al. Generation of Memory B Cells and Plasma Cells in Vitro. *Science*. 1995; 268: 720–2.
- Caesar R, Di Re M, Krupka JA, Gao J, Lara-Chica M, Dias JML, et

- al. Genetic modification of primary human B cells to model high-grade lymphoma. *Nat Commun.* 2019; 10 (1): 4543.
11. Rovsing AB, Green K, Jensen L, Nielsen IH, Mikkelsen JG, Degn SE. Multiparametric Optimization of Human Primary B-Cell Cultures Using Design of Experiments. *Scand J Immunol.* 2025; 102 (2): e70043.
 12. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2003; 112 (2): 286–97.
 13. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2004; 113 (7): 1069.
 14. Butov KR, Osipova EY, Mikhalkin NB, Trubina NM, P anteleev MA, Machlus KR. In vitro megakaryocyte culture from human bone marrow aspirates as a research and diagnostic tool. *Platelets.* 2021; 32 (7): 928–35.
 15. Schattner EJ, Elkon KB, Yoo DH, Tumang J, Krammer PH, Crow MK, Friedman SM. CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J Exp Med.* 1995; 182 (5): 1557–65. DOI: 10.1084/jem.182.5.1557.
 16. Verstegen NJ, Pollastro S, Unger PPA, Marsman C, Elias G, Jorritsma T, et al. Single-cell analysis reveals dynamics of human B cell differentiation and identifies novel B and antibody-secreting cell intermediates. *eLife.* 2023; 12: e83578.
 17. Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of Human B Cell Behavior and Amplification of Proliferative Responses following Stimulation with IL-21. *J Immunol.* 2006; 177 (8): 5236–47.
 18. Byazrova MG Astahova EA, Spiridonova AB, Vasileva YuV, Prilipov AG, Filatov AV. Stimulyaciya V-limfocitov cheloveka in vitro s pomoshch'yu IL-21/CD40L i ih harakteristika. *Immunologiya.* 2020; 41 (6): 501–10. Russian.
 19. Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol.* 2003; 171 (9): 4621–9.
 20. Ding BB, Bi E, Chen H, Yu JJ, Ye BH. IL-21 and CD40L Synergistically Promote Plasma Cell Differentiation through Upregulation of Blimp-1 in Human B Cells. *J Immunol.* 2013; 190 (4): 1827–36.
 21. Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol.* 2005; 175 (12): 7867–79.
 22. Unger PA, Verstegen NJM, Marsman C, Jorritsma T, Rispens T, Ten Brinke A, van Ham SM. Minimalistic In Vitro Culture to Drive Human Naive B Cell Differentiation into Antibody-Secreting Cells. *Cells.* 2021; 10 (5): 1183.
 23. Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Moens L, et al. Naive and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. *Journal of Experimental Medicine.* 2013; 210 (12): 2739–53.
 24. Ise W, Kurosaki T. Plasma cell differentiation during the germinal center reaction. *Immunol Rev.* 2019; 288 (1): 64–74.
 25. Robinson MJ, Pitt C, Brodie EJ, Valk AM, O'Donnell K, Nitschke L, et al. BAFF, IL-4 and IL-21 separably program germinal center-like phenotype acquisition, BCL6 expression, proliferation and survival of CD40L-activated B cells in vitro. *Immunol Cell Biol.* 2019; 97 (9): 826–39.
 26. Avery DT, Kalled SL, Ellyard JI, Ambrose C, Bixler SA, Thien M, et al. BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest.* 2003; 112 (2): 286–97.
 27. Bohnhorst JØ, Bjørgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjögren's syndrome. *J Immunol.* 2001; 167 (7): 3610–8.
 28. Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J Exp Med.* 2010; 207 (2): 353–63.
 29. Chevrier S, Kratina T, Emslie D, Tarlinton DM, Corcoran LM. IL4 and IL21 cooperate to induce the high Bcl6 protein level required for germinal center formation. *Immunol Cell Biol.* 2017; 95 (10): 925–32.
 30. Krimpenfort LT, Degn SE, Heesters BA. The follicular dendritic cell: At the germinal center of autoimmunity? *Cell Reports.* 2024; 43 (3): 113869.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОНСТРУКЦИЙ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ КАРКАСОВ ЭНДОВАСКУЛЯРНЫХ СПИРАЛЕЙ

Е. В. Чепелева¹ ✉, К. В. Козырь¹, В. П. Бородин¹, В. В. Хахалкин¹, С. В. Владимиров¹, М. А. Махмудов¹, А. Г. Бадоян¹, А. А. Баранов¹, О. В. Крестьянинов^{1,2}

¹ Национальный медицинский исследовательский центр имени Е. Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Россия

В современных условиях развитие отечественного производства медицинских изделий приобретает особое значение в контексте обеспечения устойчивости системы здравоохранения. Использование международного опыта при разработке эмболизационных спиралей с учетом возможностей российских производств позволит создать изделия, соответствующие мировым стандартам. Целью работы было провести систематический анализ шести моделей эндоваскулярных спиралей ведущих зарубежных производителей и комплексное изучение конструктивных особенностей металлических каркасов спиралей, включая оценку геометрических параметров, используемых материалов и технических решений. По результатам исследования и их сопоставления с клиническими и экспериментальными литературными данными определены оптимальные параметры для создания прототипа спирали: диаметр проволоки 0,07–0,12 мм, замковый механизм типа «спираль-сердечник» и полимерный атравматический кончик. Данные решения обеспечивают оптимальное сочетание эксплуатационных характеристик и технологичности изготовления. Полученные результаты формируют основу для разработки отечественных аналогов, соответствующих современным клиническим требованиям, с учетом имеющихся производственных возможностей.

Ключевые слова: эндоваскулярные спирали, эмболизация сосудов, сосудистая хирургия, материалы с памятью формы, технологии производства

Финансирование: исследование выполнено в рамках проекта Российского Научного Фонда № 25-15-00480.

Вклад авторов: Е. В. Чепелева — анализ данных, написание и редактирование текста статьи; К. В. Козырь, В. П. Бородин — проведение экспериментов, анализ данных, визуализация результатов; В. В. Хахалкин — концепция и дизайн исследования, анализ данных; С. В. Владимиров — проведение экспериментов, анализ данных, визуализация результатов; М. А. Махмудов, А. Г. Бадоян, А. А. Баранов — техническая поддержка, валидация данных, подготовка графических материалов; О. В. Крестьянинов — общее руководство исследованием, координация работы, редактирование и утверждение финальной версии текста.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Васильевна Чепелева
ул. Речкуновская, д. 15, г. Новосибирск, 630055, Россия; e_chepeleva@meshalkin.ru

Статья получена: 15.09.2025 **Статья принята к печати:** 30.09.2025 **Опубликована онлайн:** 23.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.048

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 METALLIC ENDOVASCULAR COIL FRAME DESIGNS

Chepeleva EV¹ ✉, Kozyr KV¹, Borodin VP¹, Khakhalkin VV¹, Vladimirov SV¹, Makhmudov MA¹, Badoian AG¹, Baranov AA¹, Krestyaninov OV^{1,2}

¹ Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

Currently the development of the production of domestic medical devices is of special importance in the context of ensuring the healthcare system sustainability. Leveraging international experience in developing embolic coils, while considering the capabilities of Russian production, will enable the creation of devices that meet global standards. The study aimed to conduct systematic evaluation of six endovascular coil models from leading foreign manufacturers and perform comprehensive assessment of the design features of the metal coil frames, including analysis of geometrical dimensions, materials used, and engineering solutions. Based on our findings and a comparison with clinical and experimental literature data we determined the optimal parameters for creating the coil prototype: the wire diameter 0.07–0.12 mm, coil-core type interlock mechanism, and atraumatic polymer tip. These solutions ensure the optimal combination of performance characteristics and manufacturability. The findings provide the basis for the development of domestic analogues meeting the today's clinical requirements, considering the available production capacity.

Keywords: endovascular coils, vascular embolization, vascular surgery, shape memory materials, production technologies

Funding: the study was conducted as part of the Russian Science Foundation project No. 25-15-00480.

Author contribution: Chepeleva EV — data analysis, manuscript writing and editing; Kozyr KV, Borodin VP — experimental procedure, data analysis, visualization of findings; Khakhalkin VV — study concept and design, data analysis; Vladimirov SV — experimental procedure, data analysis, visualization of findings; Makhmudov MA, Badoian AG, Baranov AA — technical support, data validation, graphics design; Krestyaninov OV — general research management, coordinating work, editing and approval of the final version of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena V. Chepeleva
Rechkunovskaya, 15, Novosibirsk, 630055, Russia; e_chepeleva@meshalkin.ru

Received: 15.09.2025 **Accepted:** 30.09.2025 **Published online:** 23.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.048

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/>).

Зависимость от импорта эндоваскулярных спиралей для эмболизации представляет собой серьезную проблему для системы здравоохранения Российской Федерации. Ежегодно в мире выполняются сотни тысяч операций по эмболизации сосудистых патологий, причем все изделия, используемые для этого в России, производятся зарубежными компаниями. Мировой объем продаж спиралей в 2020 г. составил около 1,14 млрд долларов США, в 2021 г. — уже 1,175 млрд долларов США, и этот показатель продолжает демонстрировать устойчивую тенденцию к росту [1]. В условиях зависимости от импорта возникает потребность в импортозамещении, что требует анализа мирового опыта для создания универсальных конструкций с оптимальными биотехническими свойствами.

Несмотря на общее назначение эндоваскулярные спирали для эмболизации сосудов значительно различаются по материалам, геометрии и размерам, но все представляют собой металлический каркас из проволоки, скрученной в первичную спираль [2]. Ключевые требования к спиральям следующие: высокая биосовместимость, контролируемая тромбогенность, оптимальная радиальная жесткость и гибкость, а также способность восстанавливать трехмерную структуру после имплантации [3]. Для усиления тромбогенности на поверхность часто наносят полимерные волокна или гидрогелевые покрытия, а конфигурация вторичной спирали варьирует в зависимости от анатомии целевого сосуда [4, 5]. Спираль вызывает необратимую эмболизацию, обеспечивая полную окклюзию сосуда за счет тромбообразования [6]. Данный эффект достигается одним из трех путей: механическая обтурация просвета сосуда, приводящая к значительному снижению кровотока; формирование тромбогенного каркаса, способствующего агрегации тромбоцитов и формированию стабильного сгустка; контролируемое повреждение сосудистой стенки, стимулирующее высвобождение эндогенных прокоагулянтных факторов. Тромботическая окклюзия обычно развивается в течение пяти минут после установки, хотя временные параметры могут варьироваться в зависимости от типа устройства, диаметра кровеносного сосуда и исходной гемодинамики в эмболизируемой области [6, 7].

Современные исследования в области эндоваскулярной эмболизации демонстрируют значительный прогресс в разработке спиралей, особенно в контексте совершенствования материалов и технологий их производства. Ключевые материалы для изготовления эндоваскулярных спиралей включают платиновые сплавы, никелид титана (нитинол), нержавеющую сталь и биodeградируемые сплавы на основе магния и цинка [2, 8]. Платиновые сплавы, несмотря на высокую стоимость, широко применяют в клинической практике благодаря исключительной рентгенконтрастности, обеспечивающей точную визуализацию во время вмешательства, оптимальной гибкости, позволяющей адаптироваться к сложной анатомии сосудов, и высокой биосовместимости, минимизирующей риски иммунных реакций [9]. Нитинол, обладающий сверхупругостью и эффектом памяти формы, позволяет восстанавливать первоначальную конфигурацию спирали после доставки, что особенно ценно при лечении сложных аневризм [10]. Спираль из нержавеющей стали рентгеноконтрастна, однако уступает в этом отношении другим материалам (например, платине и ее сплавам). Их жесткость из-за высокой прочности может осложнять плотную установку в сосуде, поэтому их преимущественно

используют для окклюзии сосудов большого диаметра [11, 12]. Биodeградируемые сплавы представляют собой перспективное направление в эндоваскулярных технологиях. Их способность к контролируемому рассасыванию после выполнения терапевтической функции позволяет минимизировать риски долгосрочных осложнений и избежать повторных вмешательств. При этом важным аспектом применения таких материалов остается обеспечение безопасности за счет мониторинга уровня ионов магния и цинка в биологических тканях [13].

Параллельно с исследованиями в области материаловедения эволюция эндоваскулярных спиралей связана с оптимизацией их конструктивных параметров. Модификации последних лет сфокусированы на совершенствовании механизмов отсоединения, увеличении длины спиралей (до 50–60 см), внедрении гибких материалов и инновационных покрытий, усиливающих тромбообразование. Морфологическое разнообразие устройств нового поколения охватывает спектр от классических двумерных конфигураций до трехмерных структур, топографически адаптированных к анатомии аневризматических мешков [4]. Внедрение нанопокровов (Target Nano, Axiom EX) и 3D-печатных конструкций (Target 3D, Micrusframe) обеспечивает эффективное заполнение как малых сложных аневризм, так и обширных полостей. Особый акцент сделан на биосовместимых покрытиях: микрофиламентах из полигликолевой/полимолочной кислоты и гидрофильных акриловых сополимерах, которые минимизируют воспалительные реакции [14–16]. Предполагается, что комбинация аддитивных технологий с биоактивными покрытиями позволит персонализировать выбор спиральных систем с учетом размера, локализации и морфологии аневризмы, повышая безопасность и эффективность эндоваскулярных вмешательств.

Разработка отечественных эндоваскулярных спиралей требует комплексного подхода, основанного на анализе актуальных достижений в области материаловедения и инженерных решений. Важна адаптация мирового опыта с учетом специфики национальной производственной инфраструктуры и нормативно-правовой базы. Это позволяет создавать конкурентоспособные медицинские технологии, соответствующие как международным стандартам, так и потребностям отечественной системы здравоохранения. Систематический анализ ключевых параметров современных зарубежных эндоваскулярных спиралей — геометрии, материалов, особенностей каркаса и технологий изготовления позволит выявить типовые конструктивные решения, характерные для разных производителей. Предполагается, что сравнение выявит доминирующие тенденции в проектировании ключевых элементов изделия и позволит классифицировать спирали по технологическим и конструктивным признакам. Понимание взаимосвязи между материалами, геометрией и производственными технологиями станет основой для формирования новых критериев, актуальных при разработке инновационных устройств.

Целью работы было изучить размеры используемых материалов и конструктивных особенностей металлических каркасов эндоваскулярных спиралей, представленных на рынке. Задачи исследования: провести систематический анализ ассортимента эндоваскулярных спиралей с точки зрения геометрических параметров (диаметр, длина, форма); выполнить микроскопический анализ конструктивных элементов металлических каркасов спиралей; охарактеризовать способы изготовления

Таблица. Характеристики эндоваскулярных спиралей. Числовые данные представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение; SD — стандартное отклонение; в скобках приведен 95%-й доверительный интервал для каждого результата измерений.

Производитель	Модель	Материал проволоки спирали	Диаметр проволоки, мм	Диаметр спирали, мм	Вид атравматического кончика	Тип замкового механизма	Крепление полимерных волокон
COOK MEDICAL LLC (США)	Nester G52754	Платина	0,125 ± 0,003 (0,116–0,134)	0,537 ± 0,004 (0,526–0,548)	Сферический, оплавленный	Спираль-спираль (винтовое соединение)	Между витками спирали за счет сил трения
COOK MEDICAL LLC (США)	MReye Flipper G20235	Inconel®	0,172 ± 0,003 (0,163–0,181)	0,777 ± 0,007 (0,760–0,794)	Сферический, паянный	Спираль-спираль (винтовое соединение)	Между витками спирали за счет сил трения
MicroVention, Inc (США)	Terumo AZUR 18 45-480810	Платина	0,072 ± 0,005 (0,059–0,085)	0,302 ± 0,004 (0,291–0,313)	Откушен, покрыт полимерным клеем	Отсоединение с помощью тока (расплавление металла)	Гидрофильный полимер в виде чехла
Boston Scientific Corporation (США)	Interlock Spiral 2D M00136155	Платина	0,079 ± 0,003 (0,070–0,088)	0,306 ± 0,004 (0,295–0,317)	Сферический, паянный	Фрезерованный замок	Между витками спирали за счет сил трения
Boston Scientific Corporation (США)	Interlock Spiral -35 M001363700	Платина	0,176 ± 0,005 (0,163–0,189)	0,526 ± 0,005 (0,513–0,539)	Сферический, паянный (диаметр больше толщины спирали)	Фрезерованный замок «паз-паз»	Между витками спирали за счет сил трения
PFM Medical GmbH	Nit-Occlud PDA 145044V1	Никелид титана	0,243 ± 0,003 (0,234–0,252)	0,763 ± 0,005 (0,750–0,776)	Сферический, паянный	Спираль-сердечник (полувинтовое соединение)	Отсутствуют

ключевых элементов спирального каркаса (атравматического кончика, основной и замковой частей); изучить особенности крепления полимерных волокон внутри каркаса и их влияние на конструкцию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали следующие эндоваскулярные спирали:

- производитель COOK MEDICAL LLC (США), модель Nester G52754;
- производитель COOK MEDICAL LLC (США), модель MReye Flipper G20235;
- производитель MicroVention, Inc (США), модель Terumo AZUR 18 45-480810;
- производитель Boston Scientific Corporation (США), модель Interlock Spiral 2D M00136155;
- производитель Boston Scientific Corporation (США), модель Interlock Spiral -35 M001363700;
- производитель PFM Medical GmbH (Германия), модель Nit-Occlud PDA 145044V1.

Исследование размеров и особенностей конструкции спиралей проводили на видеоизмерительной системе NORGAU NVMIII-2010D (ООО «Норга Руссланд», Россия).

Образцы спиралей размещали в свободном состоянии на предметном столе микроскопа без механического натяжения во избежание деформации. Для обеспечения контрастности и точности измерений применяли кольцевое отраженное освещение, позволяющее четко визуализировать контуры элементов конструкции. Измерения проводили с использованием программного обеспечения INSPEC (Micro-Vu, США). Процедура включала в себя ручное выделение контура спирали с последующим применением инструмента «Расстояние» для определения ключевых геометрических параметров: внешнего диаметра спирали (по крайним точкам витков) и толщины проволоки (по три повторных измерения для каждого параметра). Статистическую обработку результатов проводили с использованием t -критерия Стьюдента в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США). Данные в таблице представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение; SD — стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Все исследуемые спирали конструктивно представляют собой витки из проволоки диаметром 0,07–0,25 мм (таблица).

Спираль Nester G52754 (COOK MEDICAL LLC) (рис. 1) выполнена из платины и состоит из трех элементов: атравматического кончика, основной спирали с шагом, равным диаметру проволоки, и замковой части. Замковое соединение осуществляется методом навинчивания витков проксимальной части спирали (длиной около 2,2 мм) на спираль дистального участка доставочной системы. Атравматический кончик сформирован методом оплавления. Замковая спираль прикреплена к основной методом пайки. Полимерные волокна удерживаются между витками за счет трения.

Спираль MReye Flipper G20235 (COOK MEDICAL LLC) (рис. 2) аналогична Nester по конструкции, но изготовлена из сплава Inconel® семейства никель-хромовых жаропрочных сплавов. Помимо материала, от Nester спираль отличается геометрическими размерами, а также тем, что выполнена из проволоки большего диаметра.

Спираль Terumo AZUR 18 45-480810 (MicroVention, Inc.) (рис. 3) относится к семейству гидрогелевых спиралей, выполнена из платины, атравматический кончик выполнен из полимера, а главной конструктивной особенностью изделия является замковая система Electric Detachment System (EDS) для плавного и предсказуемого разъединения спирали от доставочной системы. Для реализации системы EDS доставочная система, имеющая внутри себя два тонких электрических проводника, проходящих по всей длине, подключается к рукояти (на рисунке не представлена), имеющей встроенный гальванический источник электроэнергии и кнопку активации. По нажатии кнопки активации начинается процесс электролиза, посредством которого слабый электрический ток примерно за 20 с растворяет замковый штифт, освобождая спираль.

Спираль Interlock Spiral 2D M00136155 (Boston Scientific Corporation) (рис. 4) близка к Nester и Flipper, но имеет замковый механизм «паз в паз», удерживаемый в зацеплении катетерной трубкой системы доставки. Замковый элемент диаметром 0,2 мм соединен с основной

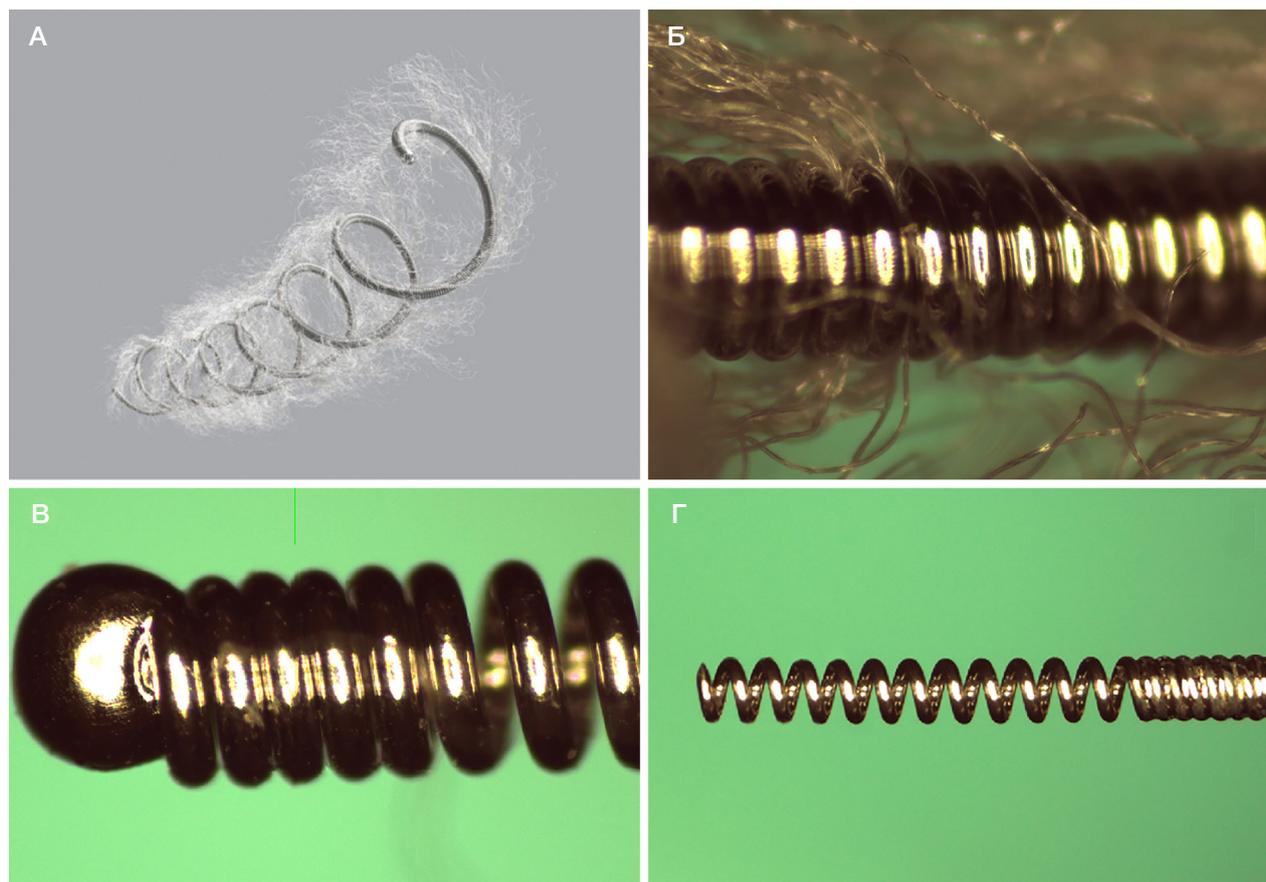


Рис. 1. Эндоваскулярная спираль Nester производства COOK MEDICAL LLC: общий вид (А); крепление волокон (Б); атравматический кончик (В); замковая часть (Г)

спиралью методом пайки. Полимерные волокна собраны в пучки и равномерно распределены между витками по длине спирали. Атравматический кончик выполнен методом напайки платинового шарика или оплавления дистального конца спирали.

Interlock Spiral-35 M001363700 (Boston Scientific Corporation) (рис. 5) конструктивно идентична предыдущей модели, но после высвобождения из доставочной системы спираль не сворачивается в витки, а хаотично распределяется в пространстве. Полимерные волокна, тоже собранные в пучки, имеют большую длину, чем у Interlock Spiral 2D. Атравматический кончик сферической формы (0,8 мм) создан методом наплавления. Замковый механизм реализован посредством накручивания витков спирали на насечки на стержне доставочной системы.

Nit-Occlud PDA 145044V1 (PFM Medical GmbH) (рис. 6) единственная из рассмотренных спиралей выполнена из никелида титана. После высвобождения из доставочной системы сворачивается в плотную жесткую вторичную спираль. Полимерные волокна отсутствуют. Замковой механизм реализован посредством накручивания витков спирали на насечки на стержне доставочной системы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При разработке сложных изделий, таких как эндоваскулярные спирали, команде разработчиков необходимо выбирать доступные материалы и стремиться к максимальному упрощению конструкции с минимизацией технологических операций. Это позволяет снизить затраты, уменьшить количество брака и сократить число этапов промежуточного контроля.

Основным фактором, определяющим жесткость спиралей, является диаметр исходной проволоки. Жесткость спирали — один из основных критериев выбора в эндоваскулярной хирургии. С появлением мягких, сверхмягких и ультрамягких моделей у врачей появилась альтернатива классическим жестким спиральям. Поскольку мягкие спирали легче вводить в пораженный участок, практическое понимание их механических свойств может помочь эндоваскулярному хирургу в выборе конкретных спиралей [17]. Соответственно, спирали, изготовленные из исходной проволоки диаметром 0,07 мм, значительно легче устанавливаются в пораженный участок по сравнению со спиральями, изготовленными из проволоки с наибольшим диаметром 0,25 мм.

Наличие атравматического кончика — обязательная характеристика изготавливаемой спирали. Основным осложнением эндоваскулярной эмболизации спиральями является риск их миграции. Одной из ключевых техник, снижающих такие риски, является «якорная» техника [18]. Использование спиралей с атравматическим кончиком позволяет хирургу минимизировать риск перфорации сосудистой стенки и повреждения эндотелия, что повышает безопасность вмешательства и способствует его большей эффективности за счет снижения интра- и послеоперационных осложнений.

Возможно, самой важной особенностью любой спирали является ее способность к окклюзии. Технология спиралей развивается с целью повышения эффективности окклюзии путем добавления различных элементов или изменения параметров спирали, обычно направленных на улучшение тромбогенности или плотности упаковки. Некоторые спирали раннего поколения, такие как Nester и Tornado

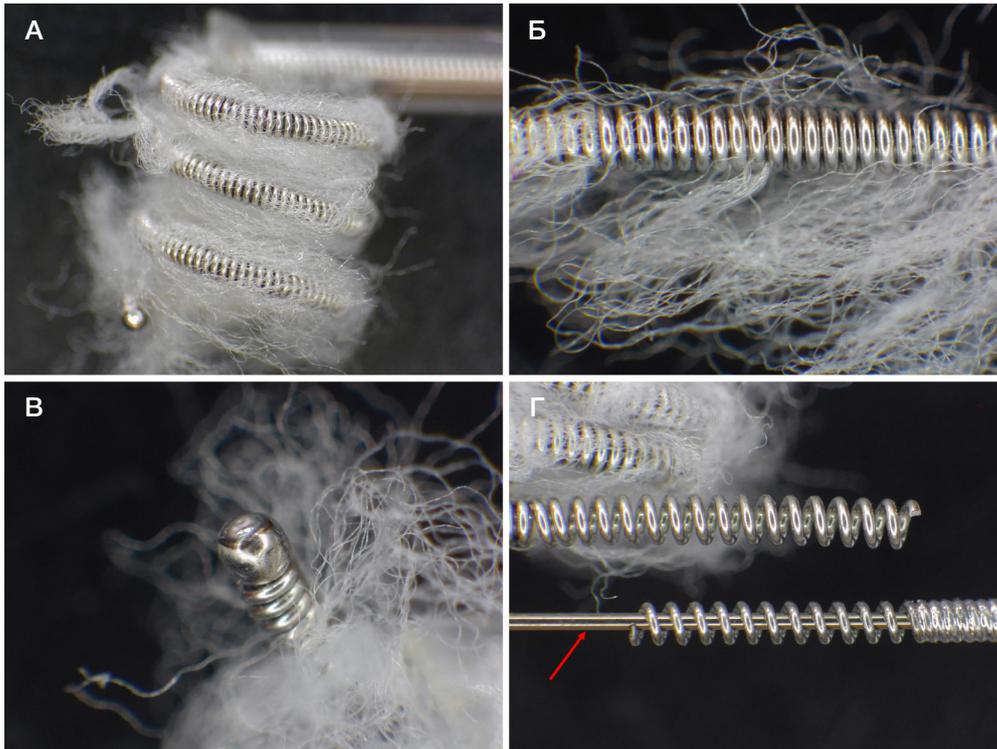


Рис. 2. Эндоваскулярная спираль MReye Flipper производства COOK MEDICAL LLC: общий вид (А); крепление волокон (Б); атравматический кончик (В); замковые части спирали и системы доставки, стержень системы доставки (красная стрелка) (Г)

(Cook Medical, Блумингтон, Индиана), представляющие собой толкаемые платиновые спирали из платины и никрома, имеют нейлоновые волокна, способствующие окклюзии за счет стимуляции образования тромба, заполняющего пространство между витками спирали [19]. Эта техника была также реализована в отсоединяемых спиралях, например, в Concerto (Medtronic) [20]. Другой подход — создание настолько мягких спиралей, что они ведут себя как жидкий металл, эффективно заполняя целевое пространство. Примером этого являются спирали семейства Ruby (Penumbra Inc, Аламеда, Калифорния)

[21]. Другие изделия, такие как AZUR CX Hydrocoil (Terumo Medical), имеют гидрогелевое покрытие, которое после доставки расширяется, заполняя пространство между витками [22]. Гидрогель начинает расширяться через 3 мин и достигает наибольшей ширины к 20 мин, поэтому может потребовать времени для полной окклюзии целевого сосуда. В одной из работ были представлены среднесрочные результаты применения спиралей с гидрогелевым и волокнистым покрытием для артериальной эмболизации в эксперименте на животных. Через месяц после процедуры артерии, эмболизированные спиралями с гидрогелевым

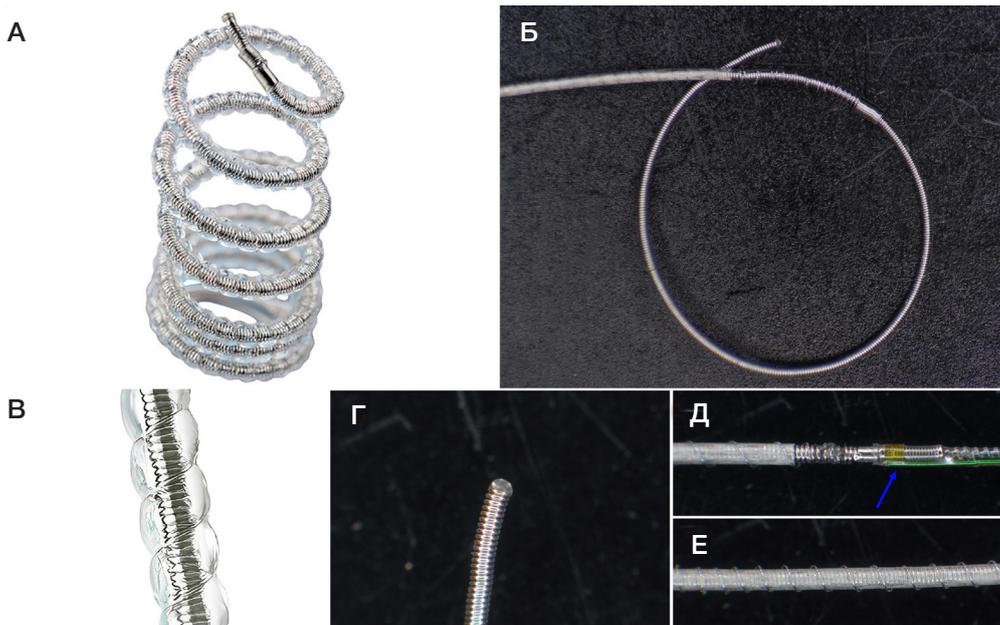


Рис. 3. Эндоваскулярная спираль Terumo AZUR 18 производства MicroVention, Inc.: общий вид (А); дистальный участок спирали, где граница начала гидрогелевого чехла отмечена красной стрелкой (Б); гидрогелевый чехол в активированном состоянии (В); атравматический кончик (Г); термозлектрическая система отщепления спирали (синяя *) (Д); гидрогелевый чехол (Е)

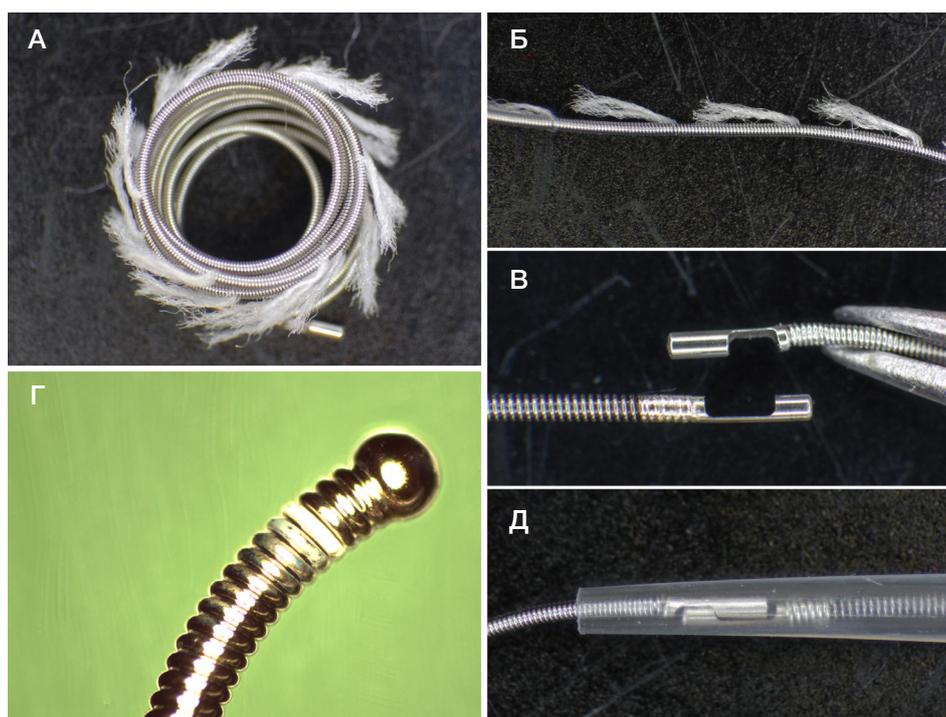


Рис. 4. Эндоваскулярная спираль Interlock Spiral 2D производства Boston Scientific Corporation: общий вид (А); крепление волокон (Б); замковые части спирали и системы доставки (В); атравматический кончик (Г); спираль и доставка в зацепленном состоянии (Д)

покрытием, были окклюзированы на 100%. Через 4 месяца результаты составили 80% [23]. Таким образом, спирали с гидрогелевым покрытием демонстрируют устойчивый окклюзирующий эффект в среднесрочной перспективе.

Анализ изученных спиралей показал, что с производственной точки зрения наиболее простую конструкцию имеют модели Flipper и Nester. Элементы каркасов этих спиралей выполнены из разных сплавов, в конструкции не используется клей, а инструменты для обработки общедоступны. Вместе с тем, платина —

дорогостоящий и не всегда свобододоступный материал. Для создания оплавленного кончика может потребоваться специализированное лазерное оборудование. Относительная простота конструкций вышеупомянутых спиралей не снижает высокую степень эффективности и безопасности применения данных устройств при лечении широкого спектра сосудистых патологий, преимущественно артериовенозных мальформаций и ятрогенных сосудистых осложнений. Анализ результатов ретроспективного когортного исследования, включающего 102 случая эндоваскулярной

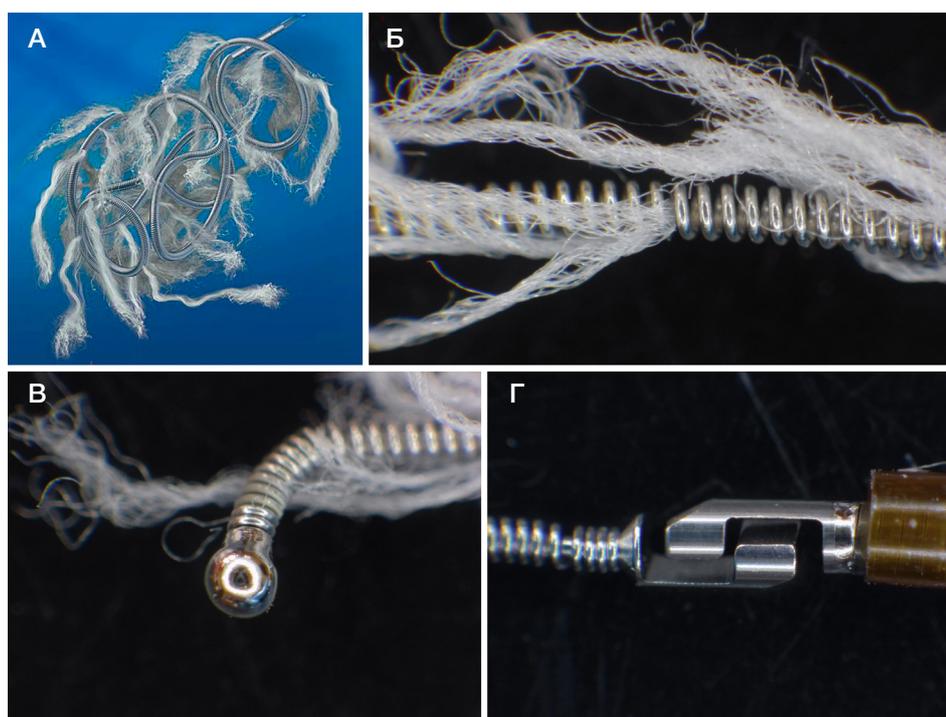


Рис. 5. Эндоваскулярная спираль Interlock Spiral-35 производства Boston Scientific Corporation: общий вид (А); крепление волокон (Б); атравматический кончик (В); замковая часть спирали (Г)

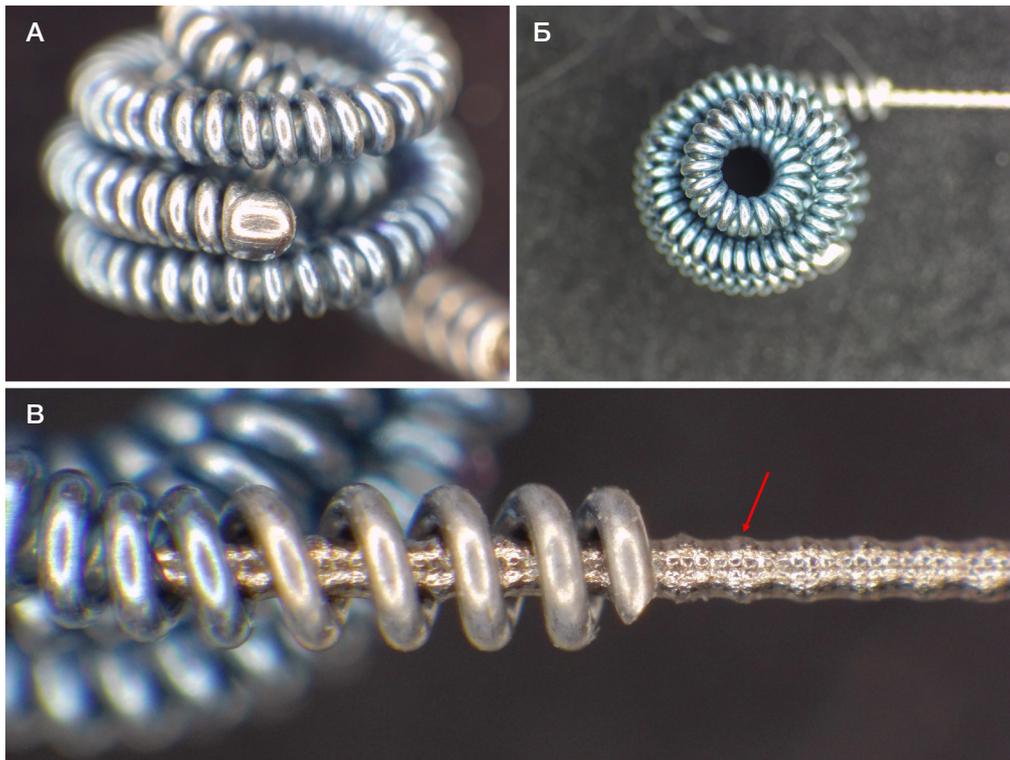


Рис. 6. Эндоваскулярная спираль Nit-Occlud PDA производства PFM Medical GmbH: atraumaticкий кончик (А); общий вид (Б); замковая часть, где винтовые насечки на стержне системы доставки для соединения со спиралью отмечены красной стрелкой (В)

эмболизации с применением окклюдизирующих спиралей Nester и Flipper, продемонстрировал стопроцентный показатель технического успеха. Клиническая эффективность, определяемая как достижение окклюзии целевого сосуда и регресс симптоматики, была отмечена у 98% пациентов. В аспекте безопасности профиль вмешательства оказался благоприятным: не отмечено ни одного случая серьезных нежелательных явлений, ассоциированных с миграцией, механической деструкцией устройств или перипроцедуральными осложнениями [24].

В спирали Terumo AZUR уязвимым местом является замковый механизм, который активируется подачей электрического тока. Подобный принцип отсоединения обладает несомненными преимуществами при применении в нейроинтервенционных процедурах, характеризующихся низкоскоростными показателями кровотока. Такая конструкция требует создания сложной и дорогостоящей электронной рукоятки системы доставки и набора токопроводящих элементов. В то же время при работе в периферических сосудах использование спиралей с электролитическим механизмом отсоединения существенно ограничивает возможность интраоперационного маневрирования и позиционирования имплантата. При этом преимущества данного технологического решения остаются неочевидными. Гидрофильный саморасширяемый чехол требует специальных знаний и опыта работы с такими материалами, а также фиксации дополнительной проволокой. Вместе с тем, применение полимерного atraumaticкого наконечника является простым технологическим процессом, который может быть положен в основу разработки новых спиралей.

Спирали Boston Scientific Corporation серии Interlock Spiral выделяются использованием длинных и разреженно расположенных полимерных волокон для эмболизации, что упрощает процесс изготовления. Однако замковый механизм выполнен в виде двух ответных цилиндрических

скобок, для изготовления которых необходимо дорогостоящее металлообрабатывающее оборудование, а высокая точность обработки и отсутствие острых краев критически важны из-за малых размеров, чтобы избежать повреждения сосудистых стенок после имплантации.

Компания PFM Medical GmbH в спирали Nit-Occlud отказалась от использования полимерных волокон, обеспечивая эмболизацию за счет плотно скрученной конструкции из упругого нитинолового сплава. Нитинол производится многими компаниями и не подлежит государственному контролю. Методы формования нитинола хорошо изучены и реализуются на доступном оборудовании. Простота замкового механизма, не требующего дополнительных деталей, также является преимуществом данной конструкции.

Разработка прототипа на основе анализа зарубежных аналогов важна, однако возможность импортозамещения эндоваскулярных спиралей сопряжена с рядом взаимосвязанных аспектов, требующих комплексного изучения. Анализ текущей ситуации на рынке медицинских изделий России демонстрирует устойчивую тенденцию к росту доли отечественной продукции [25]. Согласно Сводной стратегии развития обрабатывающей промышленности РФ до 2024 г. и на период до 2035 г., в 2022 г. 26,8% медицинских изделий в общем объеме рынка имели российское происхождение, при этом к 2030 г. планируется достижение показателя в 36%, что соответствует стратегическим целям обеспечения технологического суверенитета в критически важных отраслях [26].

Ключевым фактором развития отечественного производства выступает институциональная поддержка государства, реализуемая через механизмы субсидирования, льготного кредитования и налоговых преференций [25, 27]. Эти меры создают экономические стимулы для локализации производств, что подтверждается динамикой роста

числа российских предприятий в сегменте медицинских изделий и оборудования [28]. Однако технологическая готовность отрасли к выпуску эндоваскулярных спиралей остается ограниченной ввиду структурных проблем [26, 29]. Основным барьером является отсутствие полного цикла производства, включая зависимость от импортных субстратов и специализированного оборудования для прецизионной обработки материалов. Дополнительным фактором риска выступает необходимость соответствия продукции международным стандартам ISO 13485 и требованиям ЕАЭС, что требует модернизации систем контроля качества. Стоит отметить существенные финансовые барьеры для вывода медицинских изделий на российский рынок. По данным на октябрь 2023 г., затраты на регистрацию одного изделия в РФ достигают 1,5–7 млн рублей, а срок оформления регистрационного удостоверения может составлять 3–18 месяцев [28]. Перспективы преодоления указанных ограничений связаны с реализацией кластерного подхода, предполагающего интеграцию научно-исследовательских институтов, производственных мощностей и клинических баз. Приоритетным направлением представляется создание центров компетенций в области биосовместимых материалов и аддитивных технологий, что позволит сократить зависимость от импорта компонентов [26, 30].

Таким образом, несмотря на существующие технологические и экономические барьеры, импортозамещение эндоваскулярных спиралей в России

обладает значительным потенциалом. Ключевое условие успеха — возможность перехода от разработки прототипов к серийному производству, что требует системной государственной поддержки и привлечения внебюджетного финансирования.

ВЫВОДЫ

Сравнительный анализ эмболизирующих спиралей, изготовленных зарубежными производителями медицинской техники, показывает самые разные технические подходы, применяемые в конструкции равных по назначению и действию устройств. В качестве материалов для спиралей используют сплавы на основе платины, никелида титана и сплава никеля с хромом. Для обеспечения требуемых биотехнических характеристик в конструкции прототипа универсальной спирали, предпочтительным будет применение полимерного атравматического кончика и замкового механизма «спираль–сердечник», а в качестве материала — нитиноловой проволоки малого диаметра в диапазоне 0,07–0,12 мм. Для определения оптимальной формы и размеров спиралей планируется продолжить исследования их механических свойств и используемых полимерных волокон. Переход от разработки прототипов к серийному производству отечественных эмболизирующих спиралей возможен, но требует создания соответствующей технологической базы и существенных инвестиционных затрат.

Литература

- Henkes H, Klisch J, Lylyk P. Will coiling survive through the next decade? *J Clin Med*. 2022; 11 (11): 3230. DOI: 10.3390/jcm11113230.
- Yueqi Z, Hongbo Z, Yiran Z, Huayin W, Liming W, Gen Z, et al. Endovascular metal devices for the treatment of cerebrovascular diseases. *Adv Mater*. 2018; 30 (52): e1805452. DOI: 10.1002/adma.201805452.
- Qiu MY, Suskin CB, Becerra-Garcia JJ, Roberts SH, Rucker DG, Zayed MA, et al. Quantification of the flexural rigidity of endovascular surgical devices using three-point bending tests. *Res Sq*. 2023. Preprint. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3736325/v1.
- Campos JK, Lien BV, Wang AS, Lin L. Advances in endovascular aneurysm management: coiling and adjunctive devices. *Stroke Vasc Neurol*. 2020; 5 (1): 1–8. DOI: 10.1136/svn-2019-000303.
- Oka S, Kohno S, Arizono S, Onishi Y, Fumimoto M, Yoshida A, et al. Enhancing precision in vascular embolization: evaluating the effectiveness of the intentional early detachment technique with detachable coils in complex cases. *CVIR Endovasc*. 2024; 7 (1): 40. DOI: 10.1186/s42155-024-00453-7.
- Xiao N, Lewandowski RJ. Embolic agents: coils. *Semin Intervent Radiol*. 2022; 39 (1): 113–118. DOI: 10.1055/s-0041-1740939.
- Yuki I, Lee D, Murayama Y. Thrombus organization and healing in an experimental aneurysm model. Part II. The effect of various types of bioactive bioabsorbable polymeric coils. *J Neurosurg*. 2007; 107 (1): 109–120. DOI: 10.3171/JNS-07/07/0109.
- White JB, Ken CG, Cloft HJ, Kallmes DF. Coils in a nutshell: a review of coil physical properties. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008; 29 (7): 1242–6. DOI: 10.3174/ajnr.A1067. PMID: 18417605; PMCID: PMC8119172.
- Cowley A, Woodward B. A healthy future: platinum in medical applications. *Platin Met Rev*. 2011; 55 (2): 98–107.
- Kónya A, Maxin M, Wright KC. New embolization coil containing a nitinol wire core: preliminary in vitro and in vivo experiences. *J Vasc Interv Radiol*. 2001; 12 (7): 869–77. DOI: 10.1016/S1051-0443(07)61513-9.
- Kobeiter H, Lapeyre M, Becquemin JP, et al. Percutaneous coil embolization of postcatheterization arterial femoral pseudoaneurysms. *J Vasc Surg*. 2002; 36 (1): 127–31. DOI: 10.1067/mva.2002.124372.
- Yoshioka H, Kuroda C, Hori S, et al. Splenic embolization for hypersplenism using steel coils. *AJR Am J Roentgenol*. 1985; 144 (6): 1269–74. DOI: 10.2214/ajr.144.6.1269.
- Oliver AA, Sikora-Jasinska M, Demir AG, Guillory RJ 2nd. Recent advances and directions in the development of bioresorbable metallic cardiovascular stents: insights from recent human and in vivo studies. *Acta Biomater*. 2021; 127: 1–23. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.03.058.
- Waldau B, Fargen KM, Mack WJ, Wilson NM, Khaldi A, Hoh BL, et al. Axiom MicroFX coil for the Completing Endovascular Aneurysm Surgery Study (ACCESS). *Interv Neuroradiol*. 2012; 18 (2): 200–7. DOI: 10.1177/159101991201800213.
- Fargen KM, Blackburn S, Deshaies EM, Carpenter JS, Jabbar P, Mack WJ, et al. Final results of the multicenter, prospective Axiom MicroFX for Endovascular Repair of IntraCranial Aneurysm Study (AMERICA). *J Neurointerv Surg*. 2015; 7 (1): 40–43. DOI: 10.1136/neurintsurg-2013-011049.
- Abi-Aad KR, Aoun RJN, Rahme RJ, Ward JD, Kniss J, Kwasny MJ, et al. New generation hydrogel endovascular aneurysm treatment trial (HEAT): a study protocol for a multicenter randomized controlled trial. *Neuroradiology*. 2018; 60 (10): 1075–84. DOI: 10.1007/s00234-018-2074-5.
- White JB, Ken CG, Cloft HJ, Kallmes DF. Coils in a nutshell: a review of coil physical properties. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2008; 29 (7): 1242–6. DOI: 10.3174/ajnr.A1067. PMID: 18417605; PMCID: PMC8119172.
- Kanamaru K, Ezura M, Nishiyama Y, Yagi T, Yoshioka H, Fukumoto Y, et al. Anchor coil technique for arteriovenous fistula embolization. A technical note. *Interv Neuroradiol*. 2014; 20 (3): 283–6. DOI: 10.15274/INR-2014-10054. PMID: 24976089; PMCID: PMC4178771.
- Liebig T, Henkes H, Fischer S, Weber W, Miloslavski E, Mariushi W, et al. Fibered electrolytically detachable platinum coils used for the endovascular treatment of intracranial

- aneurysms. *Interv Neuroradiol.* 2004; 10 (1): 5–26. DOI: 10.1177/159101990401000101.
20. Girdhar G, Read M, Sohn J, Shah C, Shrivastava S. In vitro thrombogenicity assessment of polymer filament modified and native platinum embolic coils. *J Neurol Sci.* 2014; 339 (1–2): 97–101. DOI: 10.1016/j.jns.2014.01.030.
 21. Patel PJ, Arko FR 3rd. Ruby® coil and POD® system: a coil platform for fast and easy embolization. *Endovasc Today.* 2018; 17: 22–9.
 22. Ferral H. Hydrogel-coated coils: product description and clinical applications. *Semin Intervent Radiol.* 2015; 32 (4): 343–8. DOI: 10.1055/s-0035-1564809.
 23. Fohlen A, Namur J, Ghegediban H, Laurent A, Wassef M, Pelage JP. Midterm Recanalization after Arterial Embolization Using Hydrogel-Coated Coils versus Fibered Coils in an Animal Model. *J Vasc Interv Radiol.* 2019; 30 (6): 940–8. DOI: 10.1016/j.jvir.2018.05.005. PMID: 30174160.
 24. Hochreiter-Hufford A, Gatz J, Griggs AM, Schoch RD, Birmingham KM, Frederick C, et al. Real-world data to support post-market safety and performance of embolization coils: evidence generation from a medical device manufacturer and data institute partnership. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2024; 24: 263. DOI: 10.1186/s12911-024-02659-0.
 25. Макаренко Е. Д. Механизмы продвижения российского медицинского оборудования на внутреннем рынке. Финансовые рынки и банки. 2024; (3): 24–29. DOI: 10.24412/2658-3917-2024-3-24-29.
 26. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 06.06.2020 № 1512-р «Об утверждении Сводной стратегии развития обрабатывающей промышленности Российской Федерации до 2024 года и на период до 2035 года» (в ред. от 09.09.2023 № 2436-р, 07.11.2023 № 3113-р, 21.10.2024 № 2963-р).
 27. Абдикеев Н. М. Реализация планов по импортозамещению в высокотехнологичных отраслях отечественной промышленности в условиях внешних санкций. *Научные труды Вольного экономического общества России.* 2022; (3): 202–14.
 28. Ходос Д. В., Мушенко Р. Д. Перспективы развития рынка профессионального оборудования в условиях трансформации сферы медицинских услуг в РФ. *ЭВ.* 2024; 1 (36): 92–100. DOI: 10.36807/2411-7269-2024-1-36-92-100.
 29. Наход В. И., Кривенко А. Н., Буткова Т. В. Имплантируемые медицинские изделия: обзор рынка. *Здоровье мегаполиса.* 2024; 4 (1): 209–16. DOI: 10.47619/2713-2617.zm.2024.v.5i4p1.
 30. Ершова Е. Ю. Аддитивные технологии как основа наращивания потенциала национальной инновационной системы. *Вестник Академии знаний.* 2025; 4 (69): 212–6.

References

1. Henkes H, Klisch J, Lylyk P. Will coiling survive through the next decade? *J Clin Med.* 2022; 11 (11): 3230. DOI: 10.3390/jcm11113230.
2. Yueqi Z, Hongbo Z, Yiran Z, Huayin W, Liming W, Gen Z, et al. Endovascular metal devices for the treatment of cerebrovascular diseases. *Adv Mater.* 2018; 30 (52): e1805452. DOI: 10.1002/adma.201805452.
3. Qiu MY, Suskin CB, Becerra-Garcia JJ, Roberts SH, Rucker DG, Zayed MA, et al. Quantification of the flexural rigidity of endovascular surgical devices using three-point bending tests. *Res Sq.* 2023. Preprint. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3736325/v1.
4. Campos JK, Lien BV, Wang AS, Lin L. Advances in endovascular aneurysm management: coiling and adjunctive devices. *Stroke Vasc Neurol.* 2020; 5 (1): 1–8. DOI: 10.1136/svn-2019-000303.
5. Oka S, Kohno S, Arizono S, Onishi Y, Fumimoto M, Yoshida A, et al. Enhancing precision in vascular embolization: evaluating the effectiveness of the intentional early detachment technique with detachable coils in complex cases. *CVIR Endovasc.* 2024; 7 (1): 40. DOI: 10.1186/s42155-024-00453-7.
6. Xiao N, Lewandowski RJ. Embolic agents: coils. *Semin Intervent Radiol.* 2022; 39 (1): 113–118. DOI: 10.1055/s-0041-1740939.
7. Yuki I, Lee D, Murayama Y. Thrombus organization and healing in an experimental aneurysm model. Part II. The effect of various types of bioactive bioabsorbable polymeric coils. *J Neurosurg.* 2007; 107 (1): 109–120. DOI: 10.3171/JNS-07/07/0109.
8. White JB, Ken CG, Cloft HJ, Kallmes DF. Coils in a nutshell: a review of coil physical properties. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008; 29 (7): 1242–6. DOI: 10.3174/ajnr.A1067. PMID: 18417605; PMCID: PMC8119172.
9. Cowley A, Woodward B. A healthy future: platinum in medical applications. *Platin Met Rev.* 2011; 55 (2): 98–107.
10. Kónya A, Maxin M, Wright KC. New embolization coil containing a nitinol wire core: preliminary in vitro and in vivo experiences. *J Vasc Interv Radiol.* 2001; 12 (7): 869–77. DOI: 10.1016/S1051-0443(07)61513-9.
11. Kobeiter H, Lapeyre M, Becquemin JP, et al. Percutaneous coil embolization of postcatheterization arterial femoral pseudoaneurysms. *J Vasc Surg.* 2002; 36 (1): 127–31. DOI: 10.1067/mva.2002.124372.
12. Yoshioka H, Kuroda C, Hori S, et al. Splenic embolization for hypersplenism using steel coils. *AJR Am J Roentgenol.* 1985; 144 (6): 1269–74. DOI: 10.2214/ajr.144.6.1269.
13. Oliver AA, Sikora-Jasinska M, Demir AG, Guillory RJ 2nd. Recent advances and directions in the development of bioresorbable metallic cardiovascular stents: insights from recent human and in vivo studies. *Acta Biomater.* 2021; 127: 1–23. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.03.058.
14. Waldau B, Fargen KM, Mack WJ, Wilson NM, Khaldi A, Hoh BL, et al. Axiom MicroFX coil for the Completing Endovascular Aneurysm Surgery Study (ACCESS). *Interv Neuroradiol.* 2012; 18 (2): 200–7. DOI: 10.1177/159101991201800213.
15. Fargen KM, Blackburn S, Deshaies EM, Carpenter JS, Jabbour P, Mack WJ, et al. Final results of the multicenter, prospective Axiom MicroFX for Endovascular Repair of IntraCranial Aneurysm Study (AMERICA). *J Neurointerv Surg.* 2015; 7 (1): 40–43. DOI: 10.1136/neurintsurg-2013-011049.
16. Abi-Aad KR, Aoun RJN, Rahme RJ, Ward JD, Kniss J, Kwasny MJ, et al. New generation hydrogel endovascular aneurysm treatment trial (HEAT): a study protocol for a multicenter randomized controlled trial. *Neuroradiology.* 2018; 60 (10): 1075–84. DOI: 10.1007/s00234-018-2074-5.
17. White JB, Ken CG, Cloft HJ, Kallmes DF. Coils in a nutshell: a review of coil physical properties. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008; 29 (7): 1242–6. DOI: 10.3174/ajnr.A1067. PMID: 18417605; PMCID: PMC8119172.
18. Kanemaru K, Ezura M, Nishiyama Y, Yagi T, Yoshioka H, Fukumoto Y, et al. Anchor coil technique for arteriovenous fistula embolization. A technical note. *Interv Neuroradiol.* 2014; 20 (3): 283–6. DOI: 10.15274/INR-2014-10054. PMID: 24976089; PMCID: PMC4178771.
19. Liebig T, Henkes H, Fischer S, Weber W, Miloslavski E, Mariushi W, et al. Fibered electrolytically detachable platinum coils used for the endovascular treatment of intracranial aneurysms. *Interv Neuroradiol.* 2004; 10 (1): 5–26. DOI: 10.1177/159101990401000101.
20. Girdhar G, Read M, Sohn J, Shah C, Shrivastava S. In vitro thrombogenicity assessment of polymer filament modified and native platinum embolic coils. *J Neurol Sci.* 2014; 339 (1–2): 97–101. DOI: 10.1016/j.jns.2014.01.030.
21. Patel PJ, Arko FR 3rd. Ruby® coil and POD® system: a coil platform for fast and easy embolization. *Endovasc Today.* 2018; 17: 22–9.
22. Ferral H. Hydrogel-coated coils: product description and clinical applications. *Semin Intervent Radiol.* 2015; 32 (4): 343–8. DOI: 10.1055/s-0035-1564809.
23. Fohlen A, Namur J, Ghegediban H, Laurent A, Wassef M, Pelage JP. Midterm Recanalization after Arterial Embolization Using Hydrogel-Coated Coils versus Fibered Coils in an Animal Model. *J Vasc Interv Radiol.* 2019; 30 (6): 940–8. DOI: 10.1016/j.jvir.2018.05.005. PMID: 30174160.
24. Hochreiter-Hufford A, Gatz J, Griggs AM, Schoch RD, Birmingham KM, Frederick C, et al. Real-world data to support post-market

- safety and performance of embolization coils: evidence generation from a medical device manufacturer and data institute partnership. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2024; 24: 263. DOI: 10.1186/s12911-024-02659-0.
25. Makarenko ED. Mekhanizmy prodvizheniya rossijskogo medicinskogo oborudovaniya na vnutrennem rynke. *Finansovye rynki i banki.* 2024; (3): 24–29. DOI: 10.24412/2658-3917-2024-3-24-29. Russian.
 26. Rasporyazhenie Pravitel'stva Rossijskoj Federacii ot 06.06.2020 № 1512-r «Ob utverzhdenii Svodnoj strategii razvitiya obrabatyvayushchej promyshlennosti Rossijskoj Federacii do 2024 goda i na period do 2035 goda» (v red. ot 09.09.2023 № 2436-r, 07.11.2023 № 3113-r, 21.10.2024 № 2963-r). Russian.
 27. Abdikeyev NM. Realizaciya planov po importozameshcheniyu v vysokotekhnologichnyh otraslyah otechestvennoj promyshlennosti v usloviyah vneshnih sankcij. *Nauchnye trudy Vol'nogo ekonomicheskogo obshchestva Rossii.* 2022; (3): 202–14. Russian.
 28. Hodos DV, Mushenko RD. Perspektivy razvitiya rynka professional'nogo oborudovaniya v usloviyah transformacii sfery medicinskih uslug v RF. *EV.* 2024; 1 (36): 92–100. DOI: 10.36807/2411-7269-2024-1-36-92-100. Russian.
 29. Nahod VI, Krivenko AN, Butkova TV. Implantiruemye medicinskie izdeliya: obzor rynka. *Zdorov'e megapolisa.* 2024; 4 (1): 209–16. DOI: 10.47619/2713-2617.zm.2024.v.5i4p1. Russian.
 30. Ershova EYu. Additivnye tekhnologii kak osnova narashchivaniya potenciala nacional'noj innovacionnoj sistemy. *Vestnik Akademii znaniy.* 2025; 4 (69): 212–6. Russian.

ЦИТОСОВМЕСТИМОСТЬ СВОБОДНОСПЕЧЕННОЙ ПОРИСТОЙ B_4C -КЕРАМИКИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ *IN VITRO*

Е. В. Чепелева [✉], К. В. Козырь, А. А. Вавер, В. В. Хахалкин

Институт экспериментальной биологии и медицины,

Национальный медицинский исследовательский центр имени Е. Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

Материалы, применяемые при восстановлении костных дефектов, имеют ряд системных ограничений. Металлические импланты, демонстрируя высокую механическую прочность, обладают недостаточной остеоинтеграционной способностью, в то время как керамические и полимерные материалы имеют лучшую биосовместимость, но не удовлетворяют требованиям по механической надежности в зонах значительной нагрузки. В этой связи перспективным направлением представляется исследование новых классов материалов, сочетающих прочностные характеристики с остеогенным потенциалом. Цель исследования — оценить цитосовместимость пористого керамического материала на основе карбида бора (B_4C) для подтверждения возможности его использования при замещении костных дефектов. Заготовки B_4C изготавливали методом свободного спекания при 1900–2100 °С, исследование ультраструктуры поверхности полученных образцов проводили методами атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии. Цитотоксичность образцов B_4C оценивали непрямым методом по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам человека. Получены следующие показатели выживаемости клеток: для образцов после автоклавирования — 102,1% (24 ч) и 99,1% (72 ч); после обработки этиленоксидом — 110,0% (24 ч) и 94,4% (72 ч). Статистически значимых различий между группами не выявлено (*U*-критерий Манна–Уитни). Полученные результаты позволяют рассматривать B_4C -керамику как перспективное решение для костной пластики, однако для оценки ее клинического потенциала требуются дальнейшие исследования, включая разработку протоколов стерилизации для образцов большего размера и сложной формы.

Ключевые слова: карбид бора, костные импланты, керамика, стерилизация, биосовместимость

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-00187).

Вклад авторов: Е. В. Чепелева, В. В. Хахалкин — концепция и дизайн исследования; Е. В. Чепелева, К. В. Козырь, А. А. Вавер, В. В. Хахалкин — проведение экспериментов и обработка данных; Е. В. Чепелева — написание статьи; К. В. Козырь, А. А. Вавер, В. В. Хахалкин — редактирование статьи.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Васильевна Чепелева
ул. Речкуновская, 15, г. Новосибирск, 630055, Россия; e_chepeleva@meshalkin.ru, amareza@mail.ru

Статья получена: 10.09.2025 **Статья принята к печати:** 28.09.2025 **Опубликована онлайн:** 12.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.044

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/>).

CYTOCOMPATIBILITY OF PRESSURELESS SINTERED POROUS B_4C -CERAMICS ASSESSED *IN VITRO*

Chepeleva EV [✉], Kozyr KV, Vaver AA, Khakhalkin VV

Institute of Experimental Biology and Medicine, Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia

The materials used to restore bone defects have a number of systemic limitations. The metal implants showing high mechanical strength have an insufficient osseointegration capability, while ceramic and polymer materials have better biocompatibility, but do not meet the requirements of mechanical reliability in the zones of considerable load. In this regard, the study of new classes of materials combining the strength characteristics with the osseogenic potential seems to be a promising area. The study aimed to assess cytocompatibility of the boron carbide (B_4C)-based porous ceramic material to confirm the possibility of its use for bone defect replacement. The B_4C semi-finished products were manufactured by pressureless sintering at 1900–2100 °C; ultrastructure of the resulting sample surface was examined by atomic force and scanning electron microscopy. Citotoxicity of the B_4C samples was estimated by an indirect method relative to human mesenchymal stem cells. The following cell survival rates were reported: 102.1% (24 h) and 99.1% (72 h) for the samples autoclaved; 110.0% (24 h) and 94.4% (72 h) for those treated with ethylene oxide. No significant intergroup differences were revealed (Mann–Whitney U-test). The findings allow us to consider B_4C ceramics as a promising solution for bone grafting. However, further research is required to assess its clinical potential, including the development of sterilization protocols for larger and complex-shaped samples.

Keywords: boron carbide, bone implants, ceramics, sterilization, biocompatibility

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant (project No. 25-25-00187).

Author contribution: Chepeleva EV, Khakhalkin VV — study concept and design; Chepeleva EV, Kozyr KV, Vaver AA, Khakhalkin VV — experimental procedure and data processing; Chepeleva EV — manuscript writing; Kozyr KV, Vaver AA, Khakhalkin VV — manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena V. Chepeleva
Rechkunovskaya, 15, Novosibirsk, 630055, Russia; e_chepeleva@meshalkin.ru, amareza@mail.ru

Received: 10.09.2025 **Accepted:** 28.09.2025 **Published online:** 12.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.044

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/>).

Современная травматология и ортопедия сталкиваются со сложной задачей реконструкции обширных дефектов костной ткани, возникающих вследствие травм, резекций по поводу опухолей или дегенеративных заболеваний [1]. Ключевым подходом к лечению костных дефектов является использование имплантируемых материалов для их замещения. Идеальный остеопластический материал должен быть биосовместимым, обеспечивать остеоиндукцию (процесс, при котором костный заместитель служит структурным матриксом для миграции и пролиферации остеобластов), остеоиндукцию (процесс, посредством которого мезенхимные стволовые клетки и остеопрогениторные клетки активируются для дифференцировки в остеогенном направлении), а также сохранять структурно-механические свойства регенерируемой кости [2]. Универсального подхода для костной пластики в настоящее время не существует, выбор оптимального материала должен определяться конкретной клинической ситуацией, размерами дефекта и функциональными требованиями. Широко применяемый арсенал материалов для замещения костных дефектов включает в себя полимерные матрицы, биокерамику,

а также конструкционные сплавы на основе металлов, в отдельных клинических ситуациях используют ауто- или аллотрансплантаты костной ткани [2–4]. Анализ эффективности существующих решений выявляет системные ограничения, варьирующиеся в зависимости от класса материала (табл. 1) [3–11].

На сегодняшний день подходы к восстановлению костных тканей ориентированы на преодоление текущих ограничений путем разработки принципиально новых решений, среди которых можно выделить несколько ключевых направлений. Одним из наиболее перспективных является тканевая инженерия, позволяющая создавать биомиметические структуры путем комбинирования биосовместимых матриц, клеток-предшественников и биоактивных молекул для направленной стимуляции остеогенеза [4, 12–14]. Значительный потенциал связан с применением аддитивных технологий (3D-печать, селективное лазерное плавление), которые обеспечивают производство имплантов со сложной архитектурой, контролируемой пористостью и точным соответствием анатомии дефекта, что невозможно при использовании традиционных методов [3, 15, 16].

Таблица 1. Сравнительный анализ основных классов материалов для костной пластики [3–11]

Класс материала	Примеры	Преимущества	Ограничения
Биологические материалы			
Костная ткань	Аутотрансплантат	Отсутствие риска отторжения, остеоиндуктивность, остеоиндуктивность	Ограничение объема материала, дополнительное оперативное вмешательство и связанные с ним риски осложнений
	Аллотрансплантат	Отсутствие ограничений по объему материала, остеоиндуктивность, остеоиндуктивность	Риск иммунного отторжения, риск передачи вирусных и бактериальных инфекций, требуются дополнительные этапы для обработки
Природные полимеры	Белковые (коллаген, фибрин, желатин); полисахариды (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, альгинат, хитозан)	Биосовместимость, биоразлагаемость	Низкая механическая прочность, наличие природных примесей, вариативность свойств
Природные минералы	Кораллы	Биосовместимость	Ограниченная доступность, медленная резорбция
Синтетические материалы			
Металлы	Титан и его сплавы, тантал, нержавеющей сталь, магний и его сплавы	Высокая механическая прочность и износостойкость, биосовместимость	Низкая способность к биодеградации, риск токсичности из-за выделения ионов металлов, низкая устойчивость к циклическим нагрузкам
Биокерамика	Биоинертная (керамический оксид алюминия); биodeградируемая (гидроксиапатит, β -трикальцийфосфат, биостекло)	Биосовместимость, структурное сходство с костной тканью, остеоиндуктивность/остеоиндуктивность (в зависимости от структуры и состава)	Хрупкость, низкая прочность на изгиб и кручение, сложность управления скоростью резорбции
Полимеры	Биodeградируемые (поликапролактон, полимолочная кислота, полигликолевая кислота)	Биоразлагаемость, биосовместимость, универсальность	Низкая механическая прочность, риск воспаления из-за продуктов деградации
	Небиodeградируемые (полиэтилен, полиуретан)	Биосовместимость, универсальность	
Композитные материалы	Гидроксиапатит-коллагеновые матрицы, кальций-фосфатные покрытия на металлах	Сочетание механических свойств и биосовместимости	Сложность производства, высокая стоимость, возможная неоднородность структуры

Карбид бора традиционно применяют в качестве конструкционного материала благодаря высокой твердости (до 48,5 ГПа), относительно низкой плотности (~2,52 г/см³) и химической инертности [17]. На сегодняшний день свойства В₄С как самостоятельного имплантационного материала остаются малоизученными, а немногочисленные исследования сосредоточены главным образом на его роли вспомогательного компонента (модифицирующие добавки, защитные покрытия).

Целью работы было изучить биологическую совместимость керамических образцов на основе карбида бора путем исследования их цитотоксического воздействия на мезенхимные стволовые клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Заготовки спеченного карбида бора изготавливали по запатентованной технологии (патент № RU 2 836 825 С1) [18]. В ходе технологического процесса исходный порошок карбида бора («УНИХИМ с ОЗ», Россия) вместе со связующим веществом на 1 ч загружают в распылительное сушило XLB-3 (Oriental Development Limited, Китай). Далее пресс-порошок прессуют с помощью пневмогидравлического пресса СОРОКИН 7.50 («Лехт», Россия) методом холодного прессования для получения заготовки, из которой с помощью механической обработки получают детали требуемой формы. Спрессованную деталь для удаления связующего вещества помещают в муфельную печь ЭКПС-50 («Смоленское СКТБ СПУ», Россия). Затем заготовку размещают в установку горячего прессования HP W 250 (FCT Systeme GmbH, Германия), в которой происходит свободное спекание при температуре 1900–2100 °С с 14 стадиями, состоящими из нагревания, промежуточной выдержки и вакуумирования. Исходные заготовки с помощью алмазных дисков разрезали на образцы размером 5 × 5 × 30 мм, и очищали от пыли, образованной при резке, в ультразвуковой ванне CD-4830 (Codyson, Китай) в среде этилового спирта, затем отмывали в дистиллированной воде 3 раза по 40 мин. В качестве материала сравнения в работе использовали образцы аналогичного размера, изготовленные из титана марки BT 1-00 («ТНМК», Россия).

Исследование структуры поверхности образцов из карбида бора проводили на сканирующем электронном микроскопе KYKY-EM6900LV (KYKY Technology Co., Ltd., Китай) при ускоряющем напряжении 20 кВ и силе тока электронного луча 120 мкА. Топографию поверхности образцов исследовали на атомно-силовом микроскопе NTEGRA II (NT-MDT Spectrum Instruments, Россия) в полуконтактном режиме с помощью силиконового ультраострого кантилевера HA_FM A (NT-MDT Spectrum Instruments, Россия) при частоте сканирования 0,7 Гц. Для создания трехмерных топографических изображений использовали программное обеспечение Nova-Px (NT-MDT Spectrum Instruments, Россия).

Для стерилизации образцов были выбраны два широко распространенных в лабораторной и клинической практике метода — физический (автоклавирование) и химический (оксид этилена). Перед использованием в эксперименте половину образцов из карбида бора и титана стерилизовали в автоклаве (Youjoy BES-12L-B-LED, Китай) при температуре 121 °С, давлении 1,1 атм. в течение 45 мин. Оставшиеся образцы стерилизовали этиленоксидом в газовом стерилизаторе/аэраторе Steri-Vac 5XL (3M, США) при концентрации этиленоксида 750 мг/л, температуре в

камере — 37 °С, влажности — 70% в течение 3 ч. Аэрацию проводили при температуре стерилизации не менее 8 ч.

Цитотоксичность образцов оценивали непрямим методом, следуя жизнеспособности мезенхимных стволовых клеток человека (МСК) линии MSC-DP-1 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИИЦ РАН, Россия) в экстрактах, полученных выдерживанием тестируемых образцов в культуральной среде DMEM/F12 (Servicebio, Китай) при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в течение 72 ч согласно ГОСТ ISO 10993-12-2023 [19]. Поскольку МСК являются предшественниками остеобластов и играют ключевую роль в регенерации костной ткани, их использование позволяет оценить, насколько исследуемый материал будет совместим с целевой биологической средой *in vivo*.

Клетки MSC-DP-1 культивировали в среде DMEM/F12 (Servicebio, Китай) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия), 100 ЕД/мл пенициллина (Thermo Fisher Scientific, США), 100 ЕД/мл стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, США) и 2 ммоль/л L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для исследования цитотоксичности экстрактов клетки рассаживали в 96-луночные плоскодонные культуральные планшеты по 2 × 10⁴ клеток на 200 мкл среды в каждой лунке и инкубировали в течение 24 ч. Затем среду заменяли на 200 мкл экстракта. После инкубации в экстрактах при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в стандартных условиях в течение 24 и 72 ч жизнеспособность клеток измеряли с использованием набора для оценки пролиферации клеток EZcount™ XTT Cell Assay Kit (HiMedia Labs, Индия). Оптическую плотность содержимого лунок измеряли при длине волны 450 нм и референсной длине волны 690 нм с использованием микропланшетного фотометра Stat Fax-2100 (Awareness Technology, Inc., США). В качестве контроля использовали клетки, культивирующиеся в полной среде DMEM/F12. Число повторностей в каждой группе равнялось 5. Жизнеспособность клеток рассчитывали как отношение между оптической плотностью в экспериментальных группах и контроле (А):

$$\text{Жизнеспособность клеток} = \left(\frac{A_{\text{экспериментальная группа}}}{A_{\text{контроль}}} \right) \times 100\%.$$

Образец считали нетоксичным при величине показателя жизнеспособности клеток более 70% (ГОСТ ISO 10993-5-2023) [20].

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для выявления различий между группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Результаты исследования представлены в виде Me (25%; 75%), где Me — медиана, интерквартильный размах — значения 25-го и 75-го процентилей. Для коррекции на множественные сравнения использовали поправку Бонферрони, уровень значимости после коррекции составил $\alpha = 0,0125$, различия между группами считали достоверными при $p < 0,0125$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий вид образцов пористой керамики на основе карбида бора размером 5 × 5 × 30 мм представлен на рис. 1. Основные технические характеристики материала представлены в табл. 2.

На микрофотографиях поверхности спеченных образцов из карбида бора выявляется характерная

поликристаллическая структура с выраженной зеренной организацией, средний размер зерен составляет 40 мкм (рис. 2). Зерна расположены плотно, без значительных промежутков, имеют преимущественно угловатую морфологию со скругленными границами. Границы имеют сложную конфигурацию, включая двойниковые структуры и участки неполного срастания. Поверхность обладает высокопористой структурой из взаимосвязанных пор преимущественно округлой и овальной формы со средним размером 30 мкм. При анализе взаимосвязей между порами выявлены разветвленные каналы и цепочки, формирующие систему межпорового сообщения. Распределение пор в объеме материала относительно равномерное, с локальными скоплениями и зонами повышенной пористости. Стенки пор имеют гладкие поверхности с микронеровностями и частичным срастанием соседних структур.

Топографический анализ поверхности исследуемого образца демонстрирует сложную морфологию рельефа с выраженной неоднородностью микроструктуры, среднеквадратичная шероховатость образцов составила $0,203 \pm 0,037$ мкм, градиент высот — $1,563 \pm 0,607$ мкм (рис. 3). На поверхности прослеживаются элементы, представленные как возвышенностями субмикронного размера, так и неглубокими впадинами различной конфигурации. Обнаружено неравномерное распределение высотных характеристик с формированием локальных холмистых структур и участков повышенной шероховатости.

При оценке жизнеспособности МСК, культивируемых в присутствии экстрактов из образцов карбида бора, цитотоксических эффектов не было выявлено ни в экспериментальных группах, ни в группах сравнения (рис. 4). В качестве отрицательного контроля использовали заготовки из титана марки ВТ 1-00, что подтвердило воспроизводимость метода и соответствие биологического ответа в тест-системе установленным требованиям. Влияние метода стерилизации на жизнеспособность клеток также отмечено не было (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты, демонстрирующие отсутствие значимых цитотоксических эффектов спеченного карбида бора по отношению к МСК, согласуются с данными предыдущих исследований о биосовместимости материала, однако в этих работах карбид бора исследовали в виде порошка или отдельных частиц. Ранее было показано, что наночастицы B_4C , полученные методом сольвотермического синтеза, не оказывают токсического эффекта на клеточные линии HeLa (рак шейки матки) и НЕК-293 (эмбриональная почка человека) в концентрациях от 100 до 800 мкг/л [21]. Показана также биосовместимость аморфного порошка карбида бора как при контакте с соматическими клетками (фибробластами линии Hs680), так и с клетками иммунной системы (макрофагами линии RAW 264.7) [22]. Отсутствие статистически значимых различий в жизнеспособности клеток между группами,

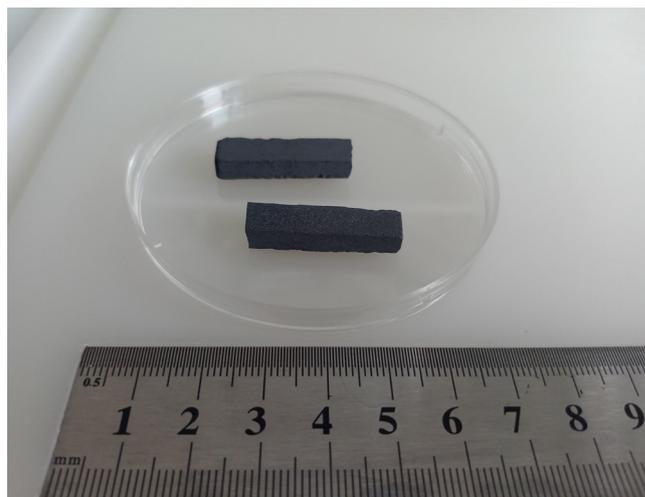


Рис. 1. Общий вид образцов B_4C -керамики, изготовленных методом свободного спекания

подвергнутыми автоклавированию и стерилизации этиленоксидом, указывает на стабильность свойств образцов B_4C и их устойчивость к сорбции токсичных соединений в процессе обработки. Следует отметить, что в данной работе использовали образцы карбида бора небольшого размера (5 × 5 × 30 мм). В дальнейшем для подбора условий стерилизации заготовок большего размера и/или сложной формы могут потребоваться дополнительные исследования, поскольку пористая структура материала может затруднять диффузию стерилизующих агентов и способствовать накоплению конденсата в глубинных зонах.

В настоящее время подавляющее большинство работ в области медицинского применения карбида бора сосредоточено на использовании наночастиц B_4C как высокоэффективных носителей для таргетной доставки изотопа бор-10 в рамках бор-нейтронозахватной терапии злокачественных новообразований [23]. В отличие от активно изучаемого терапевтического применения, вопросы, связанные с использованием B_4C в качестве биосовместимого материала для имплантологии, остаются малоизученными. Использование B_4C в качестве добавки при изготовлении пористых керамических матриц из оксида алюминия приводит к улучшению их механических свойств и цитосовместимости [24], однако детальные механизмы этих эффектов требуют дальнейшего изучения.

Основной задачей при создании пористых керамических матриц для замещения костных дефектов является оптимизация их архитектуры, которая должна обеспечивать как механическую стабильность, так и условия, способствующие эффективной диффузии питательных веществ и кислорода [25]. Оптимальное процентное соотношение пористости по результатам ряда исследований находится в пределах 40–90% [3]. Возникает фундаментальное противоречие: с одной стороны, пористость материала способствует адгезии, пролиферации и дифференцировке МСК в остеобласты, с другой стороны,

Таблица 2. Характеристика образцов B_4C -керамики, изготовленных методом свободного спекания [18]

Технические характеристики	Значение
Средний размер частиц исходного сырья	3 мкм
Плотность	1,8 г/см ³
Прочность на изгиб	250–300 МПа
Открытая пористость заготовки	50–60 %

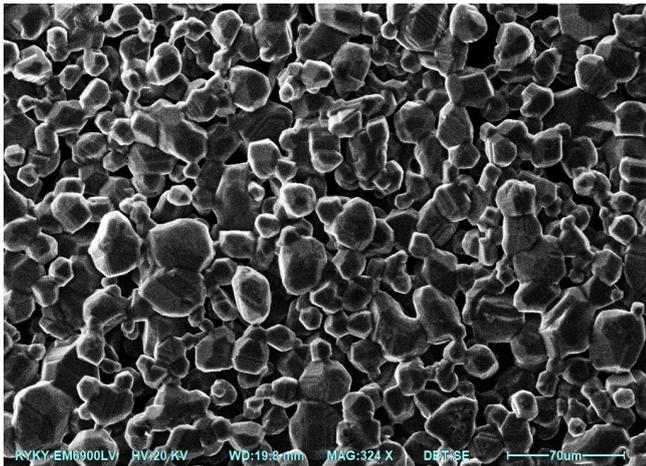


Рис. 2. Микроструктура поверхности B_4C -керамики, изготовленной методом свободного спекания. Масштабная линейка — 70 мкм

высокая степень пористости ограничивает механическую прочность, что обуславливает необходимость поиска компромисса между этими параметрами [6]. Для плотной матрицы гидроксиапатита, наиболее распространенного аллопластического материала на основе керамики, пределы прочности на изгиб лежат в диапазонах 38–250 МПа, а для пористой матрицы предел прочности на изгиб зависит от формы и концентрации пор и составляет 2–11 МПа, что значительно ниже, чем у костной ткани (135–193 МПа) [26]. Хотя существует множество способов модификации кальций-фосфатной керамики, этот материал все еще уступает костной ткани по гибкости, эластичности и прочности. Из-за их хрупкости такие имплантаты не используют для восстановления костей, несущих существенную нагрузку [6]. Как альтернативный материал в подобных случаях (например, при изготовлении компонентов эндопротеза тазобедренного сустава) может быть использован керамический оксид алюминия класса А (Al_2O_3) [27]. Пористую керамику из карбида бора теоретически можно использовать в имплантологии как альтернативу керамическим алюмооксидным материалам

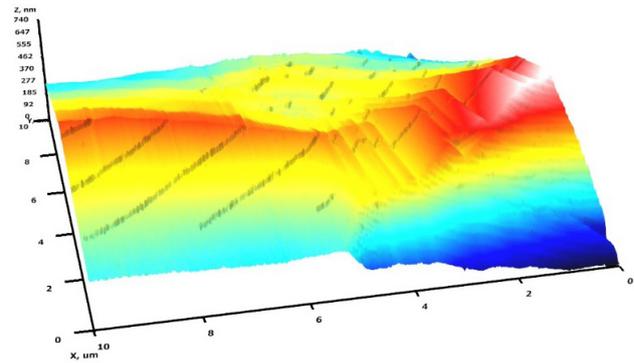


Рис. 3. ACM-изображение рельефа поверхности B_4C -керамики, изготовленной методом свободного спекания. Размер поля 10 × 10 мкм. Масштаб по оси Z: 0–0,74 мкм

для снижения нагрузки на сустав, поскольку имеет более низкий удельный вес — приблизительно $1,8 \text{ г/см}^3$, что сопоставимо с плотностью кортикальной костной ткани, в то время как плотность керамики из оксида алюминия — $3,94 \text{ г/см}^3$ [6]. Следует отметить, что прочность на изгиб керамического оксида алюминия выше, чем у спеченной керамики из карбида бора (500 МПа и 250–300 МПа соответственно). Одним из технологических решений для повышения прочности пористой B_4C -матрицы может быть импрегнирование алюминием путем нанесения на нее порошка металла и повторного спекания при температуре выше температуры плавления алюминия (более $660 \text{ }^\circ\text{C}$). Полученный таким способом керамический композит имеет относительную плотность $2,2\text{--}2,6 \text{ г/см}^3$ и прочность при изгибе не менее 600 МПа [18].

Дополнительными факторами, влияющими на адгезию и пролиферацию клеток в месте имплантации, являются геометрия пор и шероховатость поверхности материала [28]. Сложная пространственная организация пор не только увеличивает площадь для адгезии клеток, но и создает механические стимулы для их дифференцировки. В свою очередь, шероховатость поверхности способствует адгезии белков внеклеточного матрикса

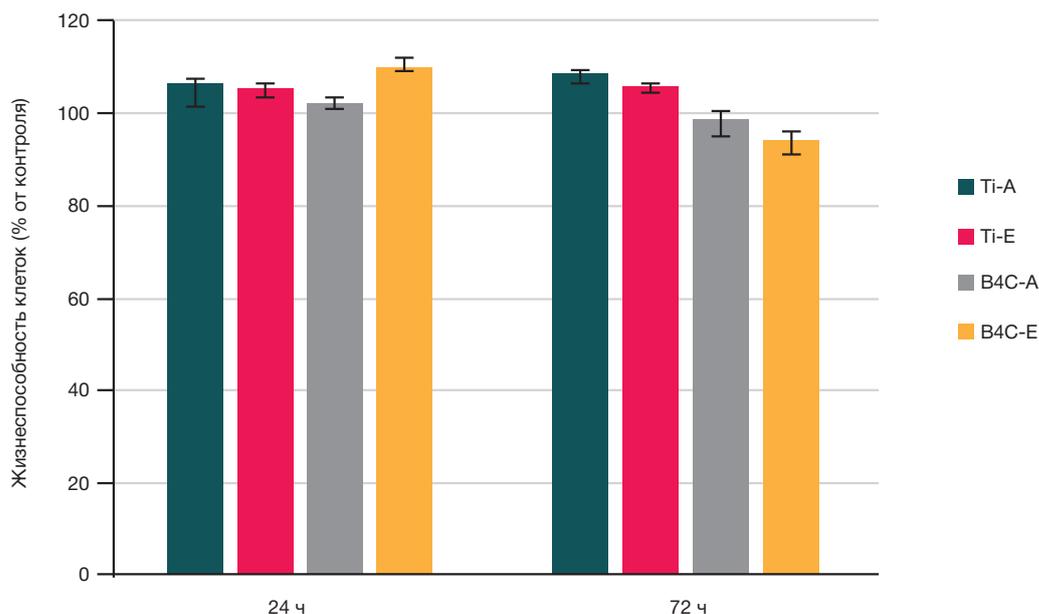


Рис. 4. Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток линии MSC-DP-1 после культивирования в течение 24 и 72 ч в присутствии экстрактов, полученных из образцов карбида бора (B_4C) и титана (Ti), стерилизованных автоклавированием (A) или этиленоксидом (E). Me (25%; 75%), U-критерий Манна-Уитни

через интегринавые рецепторы, а гидрофильность поверхности, связанная с микрорельефом, обеспечивает оптимальную смачиваемость, что способствует диффузии питательных веществ и миграции клеток [29]. Показано, что адгезия и пролиферация остеобластов на поверхностях из гидроксиапатита возрастают по мере увеличения шероховатости поверхности от $0,733 \pm 0,203$ до $4,680 \pm 0,433$ мкм [30]. Изучение адгезии и пролиферации клеток на поверхности керамики из карбида бора для определения оптимального способа обработки материала в данной работе не проводилось и запланировано в дальнейших исследованиях.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало цитосовместимость керамических образцов, изготовленных из карбида бора методом свободного спекания, что делает данный материал перспективным кандидатом для применения в медицинской имплантологии. Однако ограничения исследования, связанные с небольшими размерами образцов, требуют валидации в случае использования

в последующих экспериментах крупногабаритных или сложноструктурных заготовок. В клинической практике разработанный материал может найти применение при создании индивидуальных имплантатов для замещения дефектов костной ткани в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии, особенно в случаях, требующих сочетания механической прочности и способности к интеграции с костной тканью. Целесообразно использование B_4C -керамики в составе комбинированных конструкций для артропластики, где ее низкая плотность позволяет снизить общую массу эндопротеза. Для повышения прочности пористой матрицы из карбида бора перспективно создание композитных материалов методом пропитки заготовок расплавами металлов. Дальнейшие направления исследования биосовместимости B_4C -керамики включают в себя оценку влияния микроструктуры (размер частиц, пористость) на адгезивные свойства поверхности и остеогенную активность *in vitro*, изучение долгосрочной стабильности материала в физиологических условиях, а также исследование стресс-коррозионного поведения при циклических нагрузках, имитирующих естественную биомеханику, что особенно актуально для эндопротезирования суставов.

Литература

- Hoveidaei AH, Ghaseminejad-Raeini A, Esmaili S, Sharafi A, Ghaderi A, Pirahesh K, et al. Effectiveness of synthetic versus autologous bone grafts in foot and ankle surgery: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2024; 25 (1): 539.
- Vaiani L, Boccaccio A, Uva AE, Palumbo G, Piccinini A, Guglielmi P, et al. Ceramic materials for biomedical applications: an overview on properties and fabrication processes. *J Funct Biomater*. 2023; 14 (3): 146.
- Биялов А. Р., Минасов Б. Ш., Якупов Р. Р., Акбашев В. Н., Рафикова Г. А., Бикмеев А. Т., и др. Использование керамической 3D-печати для задач тканевой инженерии: обзор. *Политравма*. 2023; (1): 89–109. DOI: 10.24412/1819-1495-2023-1-89-109.
- Власова Т. И., Арсентьева Е. В., Худайберенова Г. Д., Полякова Д. И. Современный взгляд на использование костных заменителей и возможность усиления их остеогенности клеточными технологиями. *Медицинский вестник Башкортостана*. 2020; 15 (2): 53–58.
- Arif U, Haider S, Haider A, Khan N, Alghyamah AA, Jamila N, et al. Biocompatible polymers and their potential biomedical applications: a review. *Curr Pharm Des*. 2019; 25 (34): 3608–19. DOI: 10.2174/1381612825999191011105148.
- Мухаметов У. Ф., Люлин С. В., Борзунов Д. Ю., Гареев И. Ф., Бейлерли О. А., Yang G., и др. Аллопластические и имплантационные материалы для костной пластики: обзор литературы. *Креативная хирургия и онкология*. 2021; 11 (4): 343–53. DOI: 10.24060/2076-3093-2021-11-4-343-353.
- Popov AA, Kirsanova VA, Sviridova IK, Akhmedova SA, Filyushin MM, Sergeeva NS. Osteo-replacement properties of scleractinium coral aquaculture skeleton (experimental study). *Russ J Transplantol Artif Organs*. 2019; 21 (3): 121–6. DOI: 10.15825/1995-1191-2019-3-121-126.
- Brett E, Flacco J, Blackshear C, Longaker MT, Wan DC. Biomimetics of bone implants: the regenerative road. *Biores Open Access*. 2017; 6 (1): 1–6. DOI: 10.1089/biores.2016.0044.
- Смирнов И. В., Смирнова П. В., Тетерина А. Ю., Калита В. И., Комлев В. С. Формирование биоактивных керамических покрытий на титановых имплантатах. *Гены и клетки*. 2022; 17 (3): 215.
- Попрыгина Т. Д., Пономарева Н. И., Гордеев С. К., Самодай В. Г. Импрегнирование углеродных наноструктурных имплантатов (УНИ) костным гидроксиапатитом. *Прикладные информационные аспекты медицины*. 2022; 25 (1): 51–7. DOI: 10.18499/2070-9277-2022-25-1-51-57.
- Панкратов А. С., Фадеева И. С., Юрасова Ю. Б., Гринин В. М., Черкесов И. В., Коршунов В. В., и соавт. Остеоиндуктивный потенциал частично деминерализованного костного матрикса и возможности его использования в клинической практике. *Вестник РАМН*. 2022; 77 (2): 143–51.
- Liu J, Yang L, Liu K, Gao F. Hydrogel scaffolds in bone regeneration: their promising roles in angiogenesis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023; 11: 1217874. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1217874.
- Cichoń E, Guzik M. Bacterial-derived polyhydroxyalkanoate/bioceramic composites in clinical practice: state of the art and future perspectives. *ACS Biomater Sci Eng*. 2025; 11 (8): 4653–70.
- Fan D, Liu Y, Wang Y, Wang Q, Guo H, Cai Y, et al. 3D printing of bone and cartilage with polymer materials. *Front Pharmacol*. 2022; 13: 1044726.
- Марченко Е. С., Гордиенко И. И., Козулин А. А., Байгонакова Г. А., Борисов С. А., Гарин А. С., и др. Исследование биосовместимости пористых 3D-TiNi имплантатов в условиях *in vivo*. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. 2024; 39 (1): 184–93. DOI: 10.29001/2073-8552-2024-39-1-184-193.
- Crovace AM, Lacitignola L, Forleo DM, Staffieri F, Francioso E, Di Meo A, et al. 3D biomimetic porous titanium (Ti6Al4V ELI) scaffolds for large bone critical defect reconstruction: an experimental study in sheep. *Animals (Basel)*. 2020; 10 (8): 1389.
- Мартынов Р. С., Пак А. Я., Волокитин О. Г., Никитин Д. С., Ларионов К. Б., Поваляев П. В., и др. Синтез порошка карбида бора безвакуумным электродуговым методом и получение объемной керамики методом искрового плазменного спекания. *Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Машиностроение, материаловедение*. 2023; 25 (3): 65–76. DOI: 10.15593/2224-9877/2023.3.07.
- Хahalкин В. В., автор. Способ получения легкого керамического композита. Патент РФ № RU2836825C1. 24.03.2025.
- ГОСТ ISO 10993-12-2023. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Отбор и подготовка образцов для проведения исследований: межгосударственный стандарт: введен 2024-06-01. Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. Москва: Стандартинформ, 2023.
- ГОСТ ISO 10993-5-2023. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность методами *in vitro*: межгосударственный стандарт: введен в действие 01.06.2024.

- Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. Москва: Стандартинформ, 2023.
21. Singh P, Kaur G, Singh K, Kaur M, Kumar M, Meena R, et al. Nanostructured boron carbide (B₄C): A bio-compatible and recyclable photo-catalyst for efficient wastewater treatment. *Materialia*. 2018; 1: 258–64.
 22. Stodolak-Zych E, Gubernat A, Ścisłowska-Czarnecka A, Chadzińska M, Zych L, Zientara D, et al. The influence of surface chemical composition of particles of boron carbide powders on their biological properties. *Appl Surf Sci*. 2022; 582: 152380.
 23. Wróblewska A, Szermer-Olechnik B, Szczygieł A, Węgierek-Ciura K, Mierzejewska J, Kozieł D, et al. Macrophages as carriers of boron carbide nanoparticles dedicated to boron neutron capture therapy. *J Nanobiotechnol*. 2024; 22 (1): 183.
 24. Öksüz KE. Macro-porous aluminum oxide-boron carbide ceramics for hard tissue applications. *Recep Tayyip Erdoğan Üniv Fen Mühendis Bilim Derg*. 2023; 4 (2): 65–75.
 25. Boccaccio A, Fiorentino M, Uva AE, Laghetti LN, Monno G. Rhombicuboctahedron unit cell based scaffolds for bone regeneration: geometry optimization with a mechanobiology-driven algorithm. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018; 83: 51–66. DOI: 10.1016/j.msec.2017.09.004.
 26. Чупрунов К. О. Разработка метода получения наноструктурных сферических порошковых материалов на основе гидроксилатапата с регулируемым фазовым составом и показателями дисперсности [диссертация]. М., 2022.
 27. Некишева А. А., Абдулазизов Б. Д., Пешеходько Д. И. Обзор материалов для изготовления эндопротезов тазобедренного сустава. *Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования*. 2020; 6: 48–54.
 28. Marques A, Miranda G, Silva F, Pinto P, Carvalho Ó. Review on current limits and potentialities of technologies for biomedical ceramic scaffolds production. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021; 109 (3): 377–93. DOI: 10.1002/jbm.b.34706.
 29. Cai S, Wu C, Yang W, Liang W, Yu H, Liu L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnol Rev*. 2020; 9 (1): 971–89. DOI: 10.1515/ntrev-2020-0076.
 30. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001; 22 (1): 87–96. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00174-5.
- ### References
1. Hoveidaei AH, Ghaseminejad-Raeini A, Esmaeili S, Sharafi A, Ghaderi A, Pirahesh K, et al. Effectiveness of synthetic versus autologous bone grafts in foot and ankle surgery: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2024; 25 (1): 539.
 2. Vaiani L, Boccaccio A, Uva AE, Palumbo G, Piccininni A, Guglielmi P, et al. Ceramic materials for biomedical applications: an overview on properties and fabrication processes. *J Funct Biomater*. 2023; 14 (3): 146.
 3. Bilyalov AR, Minasov BSH, Yakupov RR, Akbashev VN, Rafikova GA, Bikmeev AT, i dr. Ispol'zovanie keramicheskoy 3D-pechati dlya zadach tkanevoj inzhenerii: obzor. *Politrama*. 2023; (1): 89–109. DOI: 10.24412/1819-1495-2023-1-89-109. Russian.
 4. Vlasova TI, Arsenteva EV, Hudajberanova GD, Polyakova DI. Sovremennyy vzglyad na ispol'zovanie kostnykh zamenitelej i vozmozhnost' usileniya ih osteogenosti kletochnymi tekhnologiyami. *Medicinskij vestnik Bashkortostana*. 2020; 15 (2): 53–58. Russian.
 5. Arif U, Haider S, Haider A, Khan N, Alghyamah AA, Jamila N, et al. Biocompatible polymers and their potential biomedical applications: a review. *Curr Pharm Des*. 2019; 25 (34): 3608–19. DOI: 10.2174/1381612825999191011105148.
 6. Muhametov UF, Lyulin SV, Borzunov DYU, Gareev IF, Bejlerli OA, Yang G, i dr. Alloplasticheskie i implantacionnye materialy dlya kostnoj plastiki: obzor literatury. *Kreativnaya hirurgiya i onkologiya*. 2021; 11 (4): 343–53. DOI: 10.24060/2076-3093-2021-11-4-343-353. Russian.
 7. Popov AA, Kirsanova VA, Sviridova IK, Akhmedova SA, Filyushin MM, Sergeeva NS. Osteo-replacement properties of scleractinium coral aquaculture skeleton (experimental study). *Russ J Transplantol Artif Organs*. 2019; 21 (3): 121–6. DOI: 10.15825/1995-1191-2019-3-121-126.
 8. Brett E, Flacco J, Blackshear C, Longaker MT, Wan DC. Biomimetics of bone implants: the regenerative road. *Biores Open Access*. 2017; 6 (1): 1–6. DOI: 10.1089/biores.2016.0044.
 9. Smirnov IV, Smirnova PV, Teterina AYU, Kalita VI, Komlev VS. Formirovanie bioaktivnykh keramicheskikh pokrytij na titanovykh implantatah. *Geny i kletki*. 2022; 17 (3): 215. Russian.
 10. Poprygina TD, Ponomareva NI, Gordeev SK, Samodaj VG. Impregnirovaniye uglevodnykh nanostrukturnykh implantatov (UNI) kostnym gidroksiapatitom. *Prilkladnye informacionnye aspekty mediciny*. 2022; 25 (1): 51–7. DOI: 10.18499/2070-9277-2022-25-1-51-57. Russian.
 11. Pankratov AS, Fadeeva IS, Yurasova YuB, Grinin VM, Cherkesov IV, Korshunov VV, i dr. Osteoinduktivnyj potencial chastichno demineralizovannogo kostnogo matriksa i vozmozhnosti ego ispol'zovaniya v klinicheskoy praktike. *Vestnik RAMN*. 2022; 77 (2): 143–51. Russian.
 12. Liu J, Yang L, Liu K, Gao F. Hydrogel scaffolds in bone regeneration: their promising roles in angiogenesis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023; 11: 1217874. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1217874.
 13. Cichoń E, Guzik M. Bacterial-derived polyhydroxyalkanoate/bioceramic composites in clinical practice: state of the art and future perspectives. *ACS Biomater Sci Eng*. 2025; 11 (8): 4653–70.
 14. Fan D, Liu Y, Wang Y, Wang Q, Guo H, Cai Y, et al. 3D printing of bone and cartilage with polymer materials. *Front Pharmacol*. 2022; 13: 1044726.
 15. Marchenko ES, Gordienko II, Kozulin AA, Bajgonakova GA, Borisov SA, Garin AS, i dr. Issledovanie biosovmestimosti poristyykh 3D-TiNi implantatov v usloviyakh *in vivo*. *Sibirskij zhurnal klinicheskoy i eksperimental'noj mediciny*. 2024; 39 (1): 184–93. DOI: 10.29001/2073-8552-2024-39-1-184-193. Russian.
 16. Crovace AM, Lacticignola L, Forleo DM, Staffieri F, Francioso E, Di Meo A, et al. 3D biomimetic porous titanium (Ti6Al4V ELI) scaffolds for large bone critical defect reconstruction: an experimental study in sheep. *Animals (Basel)*. 2020; 10 (8): 1389.
 17. Martynov RS, Pak AY, Volokitin OG, Nikitin DS, Larionov KB, Povalyaev PV, i dr. Sintez poroshka karbida bora bezvakuurnym elektrodugovym metodom i poluchenie ob'emnoj keramiki metodom iskrovogo plazmennogo spekaniya. *Vestnik Permskogo nacional'nogo issledovatel'skogo politekhnicheskogo universiteta. Mashinostroenie, materialovedenie*. 2023; 25 (3): 65–76. DOI: 10.15593/2224-9877/2023.3.07. Russian.
 18. Hahalkin VV, avtor. Sposob polucheniya legkogo keramicheskogo kompozita. Patent RF № RU2836825C1. 24.03.2025. Russian.
 19. GOST ISO 10993-12-2023. Izdeliya medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskih izdelij. CHast' 12. Otkor i podgotovka obrazcov dlya provedeniya issledovaniy: mezhgosudarstvennyj standart: vveden 2024-06-01. Mezhhgosudarstvennyj sovet po standartizacii, metrologii i sertifikacii. Moskva: Standartinform, 2023. Russian.
 20. GOST ISO 10993-5-2023. Izdeliya medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskih izdelij. CHast' 5. Issledovaniya na citotoksichnost' metodami *in vitro*: mezhgosudarstvennyj standart: vveden v dejstvie 01.06.2024. Mezhhgosudarstvennyj sovet po standartizacii, metrologii i sertifikacii. Moskva: Standartinform, 2023. Russian.
 21. Singh P, Kaur G, Singh K, Kaur M, Kumar M, Meena R, et al. Nanostructured boron carbide (B₄C): A bio-compatible and recyclable photo-catalyst for efficient wastewater treatment. *Materialia*. 2018; 1: 258–64.
 22. Stodolak-Zych E, Gubernat A, Ścisłowska-Czarnecka A, Chadzińska M, Zych L, Zientara D, et al. The influence of surface chemical composition of particles of boron carbide powders on their biological properties. *Appl Surf Sci*. 2022; 582: 152380.

23. Wróblewska A, Szermer-Olearnik B, Szczygiał A, Węgierek-Ciura K, Mierzejewska J, Kozielnik D, et al. Macrophages as carriers of boron carbide nanoparticles dedicated to boron neutron capture therapy. *J Nanobiotechnol*. 2024; 22 (1): 183.
24. Öksüz KE. Macro-porous aluminum oxide-boron carbide ceramics for hard tissue applications. *Recep Tayyip Erdoğan Üniv Fen Mühendis Bilim Derg*. 2023; 4 (2): 65–75.
25. Boccaccio A, Fiorentino M, Uva AE, Lughetti LN, Monno G. Rhombicuboctahedron unit cell based scaffolds for bone regeneration: geometry optimization with a mechanobiology-driven algorithm. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018; 83: 51–66. DOI: 10.1016/j.msec.2017.09.004.
26. Чупрунов КО. Разработка метода получения nanoструктурных сферических порошковых материалов на основе гидроксилата с регулируемым фазовым составом и показателями дисперсности [диссертация]. М., 2022. Russian.
27. Nekisheva AA, Abdulazizov BD, Peshekhodko DI. Обзор материалов для изготовления эндопротезов тазобедренного сустава. *Medicina. Sociologiya. Filosofiya. Prikladnye issledovaniya*. 2020; 6: 48–54. Russian.
28. Marques A, Miranda G, Silva F, Pinto P, Carvalho Ö. Review on current limits and potentialities of technologies for biomedical ceramic scaffolds production. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021; 109 (3): 377–93. DOI: 10.1002/jbm.b.34706.
29. Cai S, Wu C, Yang W, Liang W, Yu H, Liu L. Recent advance in surface modification for regulating cell adhesion and behaviors. *Nanotechnol Rev*. 2020; 9 (1): 971–89. DOI: 10.1515/ntrev-2020-0076.
30. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001; 22 (1): 87–96. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00174-5.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К БЕДАКВИЛИНУ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Т. Г. Смирнова^{1✉}, С. Н. Андреевская¹, Е. Е. Ларионова¹, А. С. Зайцева¹, Е. А. Киселева¹, В. В. Устинова¹, Л. Н. Черноусова¹, А. Э. Эргешов^{1,2}

¹ Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

² Российский университет медицины, Москва, Россия

Заболевания, вызываемые нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), являются проблемой здравоохранения во всем мире из-за роста заболеваемости и связанной с этим смертности. В связи со сложностью лечения микобактериоза актуален поиск препаратов, эффективных в отношении НТМБ. Бедаквилин одобрен в 2012 г. как препарат для лечения туберкулеза. Целью исследования было определить чувствительность к бедаквилину основных клинически значимых видов НТМБ, распространенных в РФ. За период 2011–2024 гг. было выделено 345 изолятов НТМБ: 289 медленнорастущих видов НТМБ (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. kansasii*, *M. xenopi*) и 56 — быстрорастущих (*M. abscessus*). Определение лекарственной чувствительности к бедаквилину проводили методом микроразведений в 96-луночной планшете, используя диапазон концентраций бедаквилаина от 0,125 мкг/мл до 4 мкг/мл. Определяли минимальную подавляющую концентрацию бедаквилаина, к которой чувствительны 50% (МПК₅₀) и 90% (МПК₉₀) штаммов НТМБ каждого вида. Показано, что в отношении *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. kansasii* МПК₅₀ бедаквилаина составила < 0,125 мкг/мл, МПК₉₀ — от < 0,125 до 0,5 мкг/мл, в отношении *M. xenopi*: МПК₅₀ — 4 мкг/мл, МПК₉₀ — > 4 мкг/мл, *M. abscessus*: МПК₅₀ — 1 мкг/мл, МПК₉₀ — 2 мкг/мл.

Ключевые слова: нетуберкулезные микобактерии, противотуберкулезные препараты, бедаквилин, минимальная подавляющая концентрация, лекарственная чувствительность

Финансирование: исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ «ЦНИИТ» Пер. № НИОКТР 123061500080-6 «Разработка импортонезависимой технологии определения минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных препаратов, эффективных в отношении клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий».

Вклад авторов: Л. Н. Черноусова, А. Э. Эргешов — дизайн исследования; В. В. Устинова, Е. А. Киселева — проведение эксперимента; Т. Г. Смирнова — анализ полученных данных, написание текста рукописи; Е. Е. Ларионова — анализ полученных данных; А. С. Зайцева — анализ литературы, подготовка черновика рукописи; С. Н. Андреевская — анализ полученных данных; все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Соблюдение этических стандартов: работа проведена в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (1964 г.) и дальнейших ее пересмотров.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Геннадьевна Смирнова
ул. Яузская аллея, д. 2, стр. 1А, г. Москва, 107564, Россия; s_tatka@mail.ru

Статья получена: 02.10.2025 **Статья принята к печати:** 18.10.2025 **Опубликована онлайн:** 30.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.054

SUSCEPTIBILITY OF THE NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA CIRCULATING IN RUSSIA TO BEDAQUILINE

Smirnova TG^{1✉}, Andreevskaya SN¹, Larionova EE¹, Zaytseva AS¹, Kiseleva EA¹, Ustinova VV¹, Chernousova LN¹, Ergeshov AE^{1,2}

¹ Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

² Russian University of Medicine, Moscow, Russia

The diseases caused by nontuberculous mycobacteria (NTM) are a public health problem all over the world due to increasing incidence and the associated mortality. Since it is difficult to treat mycobacteriosis, the search for drugs effective against NTM is relevant. Bedaquiline was approved in 2012 as a drug for tuberculosis treatment. The study aimed to determine susceptibility to bedaquiline of the main clinically significant NTM species that were common in the Russian Federation. In 2011–2024, a total of 345 NTM isolates were obtained: 289 isolates of slow growing NTM species (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. kansasii*, *M. xenopi*) and 56 of the fast growing one (*M. abscessus*). Drug susceptibility testing for bedaquiline was performed by microdilution in a 96-well plate using the bedaquiline concentration range of 0.125–4 µg/mL. The minimum inhibitory concentration of bedaquiline inhibiting 50% (MIC₅₀) and 90% (MIC₉₀) of NTM strains of each species was determined. It has been shown that the bedaquiline MIC₅₀ for *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. kansasii* is < 0.125 µg/mL, MIC₉₀ — from < 0.125 to 0.5 µg/mL, for *M. xenopi*: MIC₅₀ — 4 µg/mL, MIC₉₀ — > 4 µg/mL, *M. abscessus*: MIC₅₀ — 1 µg/mL, MIC₉₀ — 2 µg/mL.

Keywords: non-tuberculous mycobacteria, anti-tuberculosis drugs, bedaquiline, minimal inhibitory concentration, drug susceptibility

Funding: the study was conducted under the State Assignment of the Central Tuberculosis Research Institute, R&D project: 123061500080-6 "Developing an Import-Independent Technology to Determine Minimal Inhibitory Concentrations of Antibacterial Drugs Effective Against the Clinically Significant Nontuberculous Mycobacterial Species"

Author contribution: Chernousova LN, Ergeshov AE — study design; Ustinova VV, Kiseleva EA — experimental procedure; Smirnova TG — data analysis, manuscript writing; Larionova EE — data analysis; Zaytseva AS — literature review, manuscript draft writing; Andreevskaya SN — data analysis; all authors contributed to the discussion.

Compliance with ethical standards: the study was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (1964) and its further revisions.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana G. Smirnova
Yauzskaya alleya, 2, str. 1A, Moscow, 107564, Russia; s_tatka@mail.ru

Received: 02.10.2025 **Accepted:** 18.10.2025 **Published online:** 30.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.054

К нетуберкулезным микобактериям (НТМБ) относятся представители рода *Mycobacterium*, за исключением микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) и *Mycobacterium leprae* [1]. НТМБ по скорости роста в культуре принято разделять на медленно растущие и быстрорастущие микобактерии. Некоторые виды, входящие в эти группы, могут вызывать туберкулезоподобные заболевания легких и других органов [2–5].

Инфекции НТМБ представляют собой проблему для системы здравоохранения во всем мире из-за роста заболеваемости и связанной с этим смертности [6]. Более 90% всех зарегистрированных случаев заболеваний легких, вызванных НТМБ, — микобактериоза, возникают вследствие заражения *Mycobacterium avium* complex (MAC) и *Mycobacterium abscessus* [7]. Диагностика заболеваний, вызванных НТМБ, вызывает сложности из-за схожей с туберкулезом симптоматики и рентгенологической картины. Кроме того, НТМБ и МБТК не различаются при бактериоскопическом исследовании. Лечение заболеваний, вызванных НТМБ, затруднено, так как НТМБ естественно устойчивы к большинству антибактериальных препаратов (АБП) широкого спектра действия и противотуберкулезных препаратов [8, 9].

Учитывая сложность лечения микобактериоза, актуальным представляется поиск препаратов, эффективных в отношении НТМБ, например, изучение активности новых противотуберкулезных средств. Одним из таких препаратов является бедаквилин, который в 2012 г. после клинических испытаний был одобрен FDA США и включен ВОЗ в список трех основных препаратов для лечения туберкулеза с множественной и предширокой лекарственной устойчивостью возбудителя [10].

Чувствительность к бедаквилину нетуберкулезных микобактерий была описана в ограниченном числе зарубежных исследований [11–14] и может не отражать биологические особенности изолятов НТМБ, представленных в России. Чувствительность к бедаквилину нетуберкулезных микобактерий, циркулирующих в Российской Федерации, изучена на небольшом числе видов, и требуется накопление данных [15–17].

Цель исследования — изучение чувствительности к бедаквилину основных клинически значимых видов НТМБ, распространенных в РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проведена на изолятах НТМБ, выделенных от пациентов, обследованных в ФГБНУ ЦНИИТ в 2011–2024 гг. при поступлении (от каждого пациента был выделен один изолят НТМБ). Обследованные пациенты — жители следующих федеральных округов РФ: Центрального

(включая Москву и Московскую область), Северо-Западного, Южного, Приволжского и Уральского.

Идентификацию НТМБ до вида проводили методом мультиплексной ПЦР, как описано ранее [18]. В исследование включили наиболее распространенные виды НТМБ, вызывающие микобактериоз: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. abscessus*.

Определение лекарственной чувствительности к бедаквилину проводили методом микроразведений в 96-луночной планшете, используя диапазон концентраций бедаквилина 0,125–4,000 мкг/мл [19]. Использовали субстанцию бедаквилина фумарата, содержащую 82,72% активного вещества (Janssen Pharmaceutica NV, Бельгия). Навеску препарата растворяли в химически чистом диметилсульфоксиде, для получения необходимой концентрации препарата учитывали его активность.

Из культуры НТМБ готовили суспензию одиночных клеток, контролируя КОЕ на спектрофотометре Ultraspec 10 (Ultraspec, США) [20]. Из полученной суспензии готовили рабочую суспензию в среде Middlebrook 7H9 концентрацией 5×10^5 КОЕ/мл и засеивали в планшет по 100 мкл на лунку [21]. Планшеты инкубировали при 37 °С в термостате-инкубаторе Binder (Binder, Германия). Длительность культивирования составила 14 суток для медленно растущих НТМБ и 5 суток для быстрорастущих НТМБ. В каждом тесте определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) бедаквилина, которая соответствовала наибольшему разведению препарата, ингибирующему рост культуры. Для характеристики чувствительности к бедаквилину каждого исследованного вида НТМБ определяли МПК₅₀ и МПК₉₀ — минимальные концентрации бедаквилина, к которой чувствительно 50% и 90% штаммов НТМБ каждого вида [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За период 2011–2024 гг. было выделено 345 изолятов НТМБ: 289 медленно растущих видов НТМБ (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. kansasii*, *M. xenopi*) и 56 — быстрорастущих (*M. abscessus*). МПК бедаквилина в отношении исследованных видов НТМБ представлена в таблице.

Такие медленно растущие виды НТМБ, как *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, *M. kansasii*, были высокочувствительны к бедаквилину: мода МПК и МПК₅₀ бедаквилина для всех видов составила < 0,125 мкг/мл, МПК₉₀ — от < 0,125 до 0,5 мкг/мл, в зависимости от вида. Еще один вид медленно растущих НТМБ — *M. xenopi*, был мало чувствителен к бедаквилину с МПК₅₀ 4 мкг/мл и МПК₉₀ > 4 мкг/мл. Вид быстрорастущих НТМБ был умеренно чувствителен к бедаквилину с МПК₅₀ и МПК₉₀ 1 мкг/мл и 2 мкг/мл соответственно.

Таблица. МПК бедаквилина в отношении изученных видов НТМБ

Группа НТМБ	Вид НТМБ	Число изолятов	Число изолятов с МПК (мкг/мл)							Мода МПК (мкг/мл)	МПК ₅₀	МПК ₉₀
			<0,125	0,25	0,5	1	2	4	4			
Медленно растущие	<i>M. avium</i>	210	163	19	23	3	0	2	0	< 0,125	< 0,125	0,5
	<i>M. intracellulare</i>	20	18	0	1	0	0	0	1	< 0,125	< 0,125	< 0,125
	<i>M. chimaera</i>	24	24	0	0	0	0	0	0	< 0,125	< 0,125	< 0,125
	<i>M. kansasii</i>	27	24	1	2	0	0	0	0	< 0,125	< 0,125	0,25
	<i>M. xenopi</i>	8	0	0	0	0	0	6	2	4	4	> 4
Быстрорастущие	<i>M. abscessus</i>	56	5	3	13	29	6	0	0	1	1	2
	Всего	345	234	23	39	32	6	8	3			

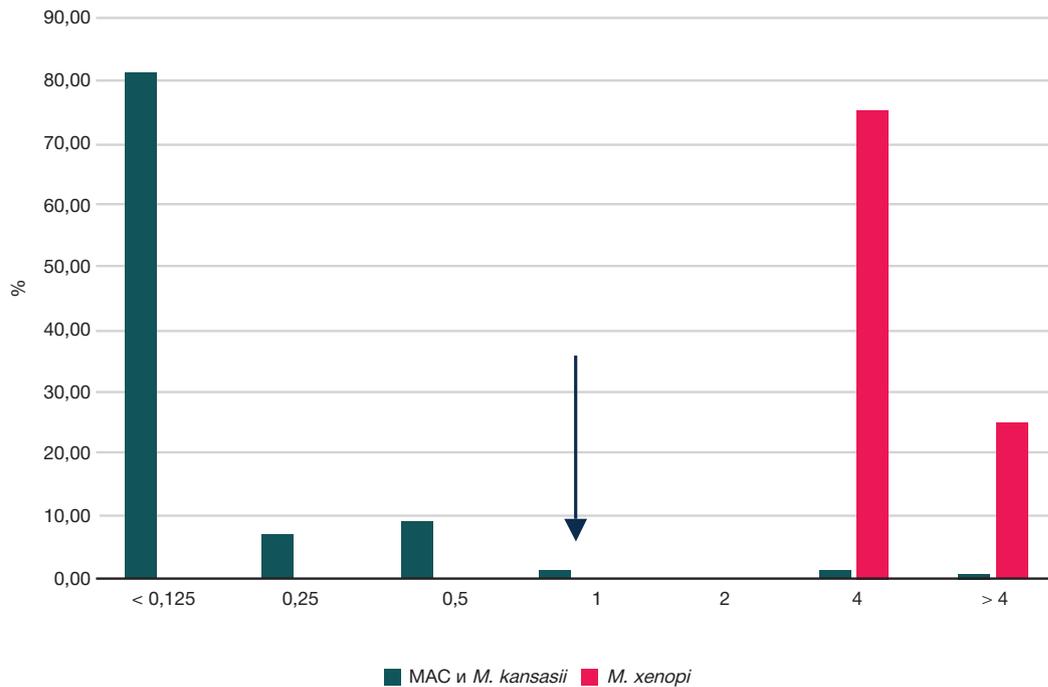


Рис. Распределение МПК бедаквиллина для исследованных видов медленнорастущих НТМБ, отличающихся уровнем чувствительности к препарату. MAC — микобактерии комплекса *M. avium* (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*); Зеленым цветом обозначена суммарная величина МПК бедаквиллина для видов медленнорастущих НТМБ, высокочувствительных к препарату (MAC и *M. kansasii*); красным — МПК *M. xenopi*, вида медленнорастущих НТМБ с низкой чувствительностью к бедаквиллину. Стрелкой показана предварительная величина ECOFF

При анализе суммарного распределения МПК для всех исследованных видов медленнорастущих НТМБ было получено бимодальное распределение, позволяющее ориентировочно определить, что предварительная эпидемиологическая точка отсечения (ECOFF) бедаквиллина в отношении медленнорастущих НТМБ не превышает 1 мкг/мл (рис.).

Основываясь на этой предварительной величине ECOFF, можно заключить, что 208/210 (99,05%; 95%ДИ 96,59–99,74%) изученных штаммов *M. avium*, 19/20 (95,00%; 95%ДИ 76,39–99,11) штаммов *M. intracellulare*, 24/24 (100%; 95%ДИ 86,20–100,00) штаммов *M. chimaera*, 27/27 (100%; 95%ДИ 87,54–100,00) штаммов *M. kansasii* чувствительны к бедаквиллину. Из всех изученных штаммов *M. xenopi* не было выявлено ни одного штамма, чувствительного к предложенной нами ECOFF бедаквиллина.

Из быстрорастущих видов НТМБ устойчивость к бедаквиллину была определена только для одного вида — *M. abscessus*, распределение МПК было одномодальным, вследствие чего ECOFF бедаквиллина для быстрорастущих видов НТМБ не была определена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Природная устойчивость НТМБ к большинству АБП делает актуальной проблему поиска новых препаратов, эффективных в отношении этой группы микобактерий. В представленном исследовании приведены данные оценки чувствительности к бедаквиллину основных клинически значимых видов НТМБ. Распределение чувствительности к бедаквиллину НТМБ каждого вида было одномодальным, что свидетельствовало о видоспецифической чувствительности исследованных видов НТМБ к этому препарату. *M. kansasii* и НТМБ комплекса *M. avium* (MAC), в который входят *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chimaera*, оказались высокочувствительны к бедаквиллину (мода МПК — < 0,125 мкг/мл). *M. abscessus* — менее чувствительны (мода

МПК — 1 мкг/мл) и самый низкий уровень чувствительности был установлен для *M. xenopi* (мода МПК — 4 мкг/мл).

Полученные нами результаты для видов НТМБ, входящих в MAC, и для *M. kansasii*, совпали с результатами, полученными в ряде исследований в других странах, и позволяют утверждать, что бедаквиллин имеет высокую активность в отношении этих видов НТМБ [12–14].

Данных по чувствительности к бедаквиллину штаммов *M. xenopi* недостаточно. По некоторым сообщениям, чувствительность к бедаквиллину одного лабораторного штамма *M. xenopi* составила > 2 мкг/мл, что соответствует полученным нами результатам [12]. В другом исследовании, описывающем лекарственную чувствительность к бедаквиллину НТМБ, циркулирующих в Китае, было исследовано четыре клинических штамма *M. xenopi*, МПК бедаквиллина для которых колебалась в широком диапазоне — от 0,0016 мкг/мл до 1 мкг/мл, что существенно ниже, чем определено нами [14].

В ряде работ было предложено значение ECOFF бедаквиллина в отношении медленнорастущих НТМБ, составившее 1 мкг/мл, что совпало с величиной ECOFF бедаквиллина, установленной в нашем исследовании [13, 23]. Интересно отметить, что данная ECOFF выше, чем ECOFF бедаквиллина для *M. tuberculosis*, равная 0,125 мкг/мл, что дополнительно демонстрирует более высокий уровень устойчивости НТМБ к противотуберкулезным препаратам по сравнению с возбудителем туберкулеза [19].

Чувствительность к бедаквиллину вида быстрорастущих НТМБ *M. abscessus* была исследована ранее [13]. По результатам этого исследования МПК бедаквиллина в отношении *M. abscessus* распределялась бимодально с модами МПК 0,13 мкг/мл и > 16 мкг/мл, МПК₅₀ и МПК₉₀ бедаквиллина составили 0,13 мкг/мл и >16 мкг/мл соответственно. В нашей работе, проведенной на 56 штаммах *M. abscessus*, было получено одномодальное распределение МПК с модой 1 мкг/мл, а МПК₉₀ составило 2 мкг/мл. Полученные различия могут указывать на уникальные

характеристики популяций *M. abscessus*, выделяемых на территориях России (представленное исследование) и Китая [13].

ВЫВОДЫ

Представленное исследование дает важную информацию о чувствительности к АБП основных клинически значимых видов НТМБ, циркулирующих в Российской Федерации. Согласно полученным данным установлена

высокая эффективность бедаквилина в отношении МАС, которые являются основными возбудителями микобактериоза в мире, и в отношении *M. kansasii*. Другие виды НТМБ оказались менее чувствительны к этому препарату. Необходимо продолжение исследований для накопления данных по чувствительности к бедаквилину НТМБ разных видов и определения корреляции между чувствительностью НТМБ *in vitro* и клинической эффективностью бедаквилина при лечении микобактериоза.

Литература

- Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev. 2014; 27: 727–52.
- Raju RM, Raju SM, Zhao Y, Rubin EJ. Leveraging advances in tuberculosis diagnosis and treatment to address nontuberculous mycobacterial disease. Emerg Infect Dis. 2016; 22 (3): 365–9.
- Оттен Т. Ф., Васильев А. В. Микобактериоз. СПб: Медицинская пресса, 2005; 224 с.
- Литвинов В. И., Макарова М. В., Краснова М. А. Нетуберкулезные микобактерии. М.: МНПЦБТ, 2008; 256 с.
- Литвинов В. И., Богородская Е. М., Борисов С. Е. Нетуберкулезные микобактерии, микобактериозы М.: МНПЦБТ, 2014; 256 с.
- Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis. 2014; 18: 1370–7.
- Wu ML, Aziz DB, Dartois V, Dick T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. Drug Discov Today. 2018; 23: 1502–19.
- Baldwin SL, Larsen SE, Ordway D, Cassell G, Coler RN. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13: e0007083.
- Yilmaz N, Yilmazel Ucar E, Saglam L. *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria coinfection of the lungs. Turk Thorac J. 2017; 18: 23–6.
- Mahajan R. Bedaquiline: first FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. Int J App Basic Med Res. 2013; 3: 1–2.
- Aguilar-Ayala DA, Cnockaert M, André E, Andries K, Gonzalez-Y-Merchand JA, Vandamme P et al. In vitro activity of bedaquiline against rapidly growing nontuberculous mycobacteria. J Med Microbiol. 2017; 66: 1140–3.
- Martin A, Godino IT, Aguilar-Ayala DA, Mathys V, Lounis N, Villalobos HR. In vitro activity of bedaquiline against slow-growing nontuberculous mycobacteria. J Med Microbiol. 2019; 68 (8): 1137–9.
- Pang Y, Zheng H, Tan Y, Song Y, Zhao Y. In vitro activity of bedaquiline against nontuberculous mycobacteria in China. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61 (5): e02627–16.
- Yu X, Gao X, Li C, Luo J, Wen S, Zhang T. et al. In vitro activities of bedaquiline and delamanid against nontuberculous mycobacteria isolated in Beijing, China. Antimicrob Agents Chemother. 2019; 63 (8): e00031–19.
- Макарова М. В., Михайлова Ю. Д., Хачатурьянц Е. Н., Литвинов В. И. Изучение лекарственной чувствительности к бедаквилину быстрорастущих микобактерий комплекса *M. chelonae–M. abscessus*. Туберкулез и социально значимые заболевания. 2022; 10 (4): 42–49.
- Макарова М. В., Михайлова Ю. Д., Хачатурьянц Е. Н., Литвинов В. И. Лекарственная чувствительность к бедаквилину штаммов *M. kansasii*, выделенных в противотуберкулезных учреждениях Москвы. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2023; 22 (3): 64–69.
- Макарова М. В., Михайлова Ю. Д., Свириденко М. А., Хачатурьянц Е. Н., Литвинов В. И. Изучение активности бедаквилина *in vitro* в отношении *Mycobacterium fortuitum* complex. Туберкулез и социально значимые заболевания. 2024; 12 (1): 30–35.
- Smirnova T, Ustinova V, Andreevskaya S, Larionova E, Kiseleva E, Chernousova L, et al. Evaluation of a new assay for nontuberculous mycobacteria species identification in diagnostic material and cultures. Tuberculosis (Edinb). 2021; 130: 102124.
- Optimized broth microdilution plate methodology for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Geneva: World Health Organization, 2022.
- Kralik P, Beran V, Pavlik I. Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. BMC Res Notes. 2012; 5: 114.
- Jaffré J, Aubry A, Maitre T, Morel F, Brossier F, Robert J et al. Rational choice of antibiotics and media for *Mycobacterium avium* complex drug susceptibility testing. Front Microbiol. 2020; 11: 81.
- Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd ed. CLSI standard document M24. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- Wang M, Men P, Zhang W, Wu J, Gu Y, Wang F, et al. Bedaquiline susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus* complex and *Mycobacterium avium* complex: A meta-analysis study. J Glob Antimicrob Resist. 2024; 37: 135–40.

References

- Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. Clin Microbiol Rev. 2014; 27: 727–52.
- Raju RM, Raju SM, Zhao Y, Rubin EJ. Leveraging advances in tuberculosis diagnosis and treatment to address nontuberculous mycobacterial disease. Emerg Infect Dis. 2016; 22 (3): 365–9.
- Otten TF, Vasilev AV. Mikobakterioz. SPb: Medicinskaya pressa, 2005; 224 s. Russian.
- Litvinov VI, Makarova MV, Krasnova MA. Netuberkuleznye mikobakterii. M.: MNPCBT, 2008; 256 s. Russian.
- Litvinov VI, Bogorodskaya EM, Borisov SE. Netuberkuleznye mikobakterii, mikobakteriozy M.: MNPCBT, 2014; 256 s. Russian.
- Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis. 2014; 18: 1370–7.
- Wu ML, Aziz DB, Dartois V, Dick T. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. Drug Discov Today. 2018; 23: 1502–19.
- Baldwin SL, Larsen SE, Ordway D, Cassell G, Coler RN. The complexities and challenges of preventing and treating nontuberculous mycobacterial diseases. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13: e0007083.
- Yilmaz N, Yilmazel Ucar E, Saglam L. *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria coinfection of the lungs. Turk Thorac J. 2017; 18: 23–6.

10. Mahajan R. Bedaquiline: first FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *Int J App Basic Med Res.* 2013; 3: 1–2.
11. Aguilar-Ayala DA, Cnockaert M, André E, Andries K, Gonzalez-Y-Merchand JA, Vandamme P et al. In vitro activity of bedaquiline against rapidly growing nontuberculous mycobacteria. *J Med Microbiol.* 2017; 66: 1140–3.
12. Martin A, Godino IT, Aguilar-Ayala DA, Mathys V, Lounis N, Villalobos HR. *In vitro* activity of bedaquiline against slow-growing nontuberculous mycobacteria. *J Med Microbiol.* 2019; 68 (8): 1137–9.
13. Pang Y, Zheng H, Tan Y, Song Y, Zhao Y. In vitro activity of bedaquiline against nontuberculous mycobacteria in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (5): e02627–16.
14. Yu X, Gao X, Li C, Luo J, Wen S, Zhang T. et al. In vitro activities of bedaquiline and delamanid against nontuberculous mycobacteria isolated in Beijing, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (8): e00031–19.
15. Makarova MV, Mihajlova YuD, Hachatur'yanc EN, Litvinov VI. Izuchenie lekarstvennoj chuvstvitel'nosti k bedakvilinu bystrorastushchih mikobakterij kompleksa *M. chelonae*–*M. abscessus*. *Tuberkulez i social'no znachimye zabolevaniya.* 2022; 10 (4): 42–49. Russian.
16. Makarova MV, Mihajlova YuD, Hachatur'yanc EN, Litvinov VI. Lekarstvennaya chuvstvitel'nost' k bedakvilinu shtammov *M. kansasii*, vydelennyh v protivotuberkuleznyh uchrezhdeniyah Moskvyy. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika.* 2023; 22 (3): 64–69. Russian.
17. Makarova MV, Mihajlova YuD, Sviridenko MA, Hachatur'yanc EN, Litvinov VI. Izuchenie aktivnosti bedakvilina *in vitro* v otnoshenii *Mycobacterium fortuitum* complex. *Tuberkulez i social'no znachimye zabolevaniya.* 2024; 12 (1): 30–35. Russian.
18. Smirnova T, Ustinova V, Andreevskaya S, Larionova E, Kiseleva E, Chernousova L, et al. Evaluation of a new assay for nontuberculous mycobacteria species identification in diagnostic material and cultures. *Tuberculosis (Edinb).* 2021; 130: 102124.
19. Optimized broth microdilution plate methodology for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Geneva: World Health Organization, 2022.
20. Kralik P, Beran V, Pavlik I. Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. *BMC Res Notes.* 2012; 5: 114.
21. Jaffré J, Aubry A, Maitre T, Morel F, Brossier F, Robert J et al. Rational choice of antibiotics and media for *Mycobacterium avium* complex drug susceptibility testing. *Front Microbiol.* 2020; 11: 81.
22. Susceptibility Testing of Mycobacteria, *Nocardia* spp., and Other Aerobic Actinomycetes, 3rd ed. CLSI standard document M24. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
23. Wang M, Men P, Zhang W, Wu J, Gu Y, Wang F, et al. Bedaquiline susceptibility testing of *Mycobacterium abscessus* complex and *Mycobacterium avium* complex: A meta-analysis study. *J Glob Antimicrob Resist.* 2024; 37: 135–40.

НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИЛЛЮЗИИ, ВЫЗВАННОЙ ЗЕРКАЛЬНОЙ ВИЗУАЛЬНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗЬЮ

О. А. Мокиенко^{1,2}✉, П. Д. Бобров^{1,3}, А. А. Соловьева¹, М. Р. Исаев^{1,3}, Я. В. Керечанин^{1,3}, В. Ю. Ратникова¹, В. А. Катайцев¹, Е. Д. Шагина¹, В. Б. Никишина¹

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Российский центр неврологии и нейронаук, Москва, Россия

³ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Москва, Россия

Нейрофизиологические механизмы иллюзии, вызванной зеркальной визуальной обратной связью, остаются недостаточно изученными, несмотря на клиническое применение зеркальной терапии при фантомном болевом синдроме и при постинсультном гемипарезе. Цель исследования — определить нейрофизиологические корреляты зеркальной иллюзии у здоровых людей методами одновременной регистрации электроэнцефалографии (ЭЭГ) и ближней инфракрасной спектроскопии (БИКС). Обследовано 30 здоровых добровольцев (12 мужчин, 18 женщин; средний возраст 24 ± 8 лет). Экспериментальная процедура включала три блока: бимануальное движение без зеркала, движение одной рукой с зеркалом; тактильная стимуляция с зеркалом. Анализировали степень десинхронизации ЭЭГ-ритмов альфа-диапазона (8–13 Гц) в первичных сенсомоторных областях, дополнительной моторной области и задней теменной коре, а также методом БИКС, изменение концентрации окси- и дезоксигемоглобина (HbO и HbR). При движении рукой с зеркалом происходила билатеральная активация первичных сенсомоторных областей обоих полушарий: десинхронизация мю-ритма 9,71 [2,82; 16,20]%, в контралатеральном и 5,64 [2,84; 12,13]%, в ипсилатеральном полушарии ($p = 0,797$), а также увеличение концентрации HbO на 6,88 [3,07; 17,20] нмоль/л в контралатеральном и на 4,91 [0,11; 14,59] нмоль/л в ипсилатеральном полушарии ($p = 0,094$). Корреляции между ЭЭГ и БИКС-показателями выявлены лишь в задней теменной коре ($r_s = 0,527$, $p = 0,003$). Субъективные характеристики иллюзии коррелировали с эмоциональной реакцией, и лишь отдельные из них слабо коррелировали с нейрофизиологическими показателями. ЭЭГ и БИКС дополняют, но не заменяют друг друга при изучении зеркальной иллюзии, формирование которой обусловлено многоуровневой сетевой организацией мозговых процессов.

Ключевые слова: зеркальная иллюзия, зеркальная визуальная обратная связь, электроэнцефалография, ближняя инфракрасная спектроскопия, кора головного мозга, нейрофизиологические маркеры

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 125022602910-2.

Благодарности: авторы признательны участникам исследования за их вклад в развитие научного знания.

Вклад авторов: О. А. Мокиенко — дизайн исследования, анализ результатов, написание статьи; П. Д. Бобров — анализ данных, написание статьи; А. А. Соловьева — проведение экспериментов, анализ результатов; М. Р. Исаев, Я. В. Керечанин — анализ данных; В. Ю. Ратникова, В. А. Катайцев — проведение экспериментов; Е. Д. Шагина — дизайн исследования, обсуждение результатов; В. Б. Никишина — концептуализация исследования, обсуждение результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Института клинической психологии и социальной работы РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 28 от 23 октября 2024 г.). Все участники подписали добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Олеся Александровна Мокиенко
ул. Островитянова, д. 1, с. 1, г. Москва, 117997, Россия; o.mokienko@ihna.ru

Статья получена: 29.09.2025 **Статья принята к печати:** 16.10.2025 **Опубликована онлайн:** 28.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.052

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/>).

NEUROPHYSIOLOGICAL MARKERS OF THE ILLUSION CAUSED BY THE MIRROR VISUAL FEEDBACK

Mokienko OA^{1,2}✉, Bobrov PD^{1,3}, Soloveva AA¹, Isaev MR^{1,3}, Kerchanin YaV^{1,3}, Ratnikova VYu¹, Kataitsev VA¹, Shagina ED¹, Nikishina VB¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Russian Center of Neurology and Neurosciences, Moscow, Russia

³ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Neurophysiological mechanisms underlying the illusion caused by the mirror visual feedback are still poorly understood, despite the clinical use of mirror therapy for phantom pain and post-stroke hemiparesis. The study aimed to determine the mirror illusion neurophysiological correlates by the simultaneous use of electroencephalography (EEG) recording and near-infrared spectroscopy (NIRS). A total of 30 healthy volunteers (12 males, 18 females; average age 24 ± 8 years) were assessed. The experimental procedure consisted of three blocks: bimanual movement without a mirror; moving one hand with the mirror; tactile stimulation with the mirror. We analyzed the degree of EEG alpha rhythm (8–13 Hz) desynchronization in primary sensorimotor areas, supplementary motor area, and the posterior parietal cortex. Furthermore, changes in the concentrations of oxy- and deoxyhemoglobin (HbO and HbR) were assessed by NIRS. When moving the hand with the mirror, bilateral activation of primary sensorimotor areas occurred in both hemispheres: mu rhythm desynchronization, 9.71 [2.82; 16.20]%, in the contralateral and 5.64 [2.84; 12.13]%, in the ipsilateral hemispheres ($p = 0.797$), along with the HbO concentration increase by 6.88 [3.07; 17.20] nmol/L in the contralateral and by 4.91 [0.11; 14.59] nmol/L in the ipsilateral hemispheres ($p = 0.094$). The correlations between EEG and NIRS parameters were reported for the posterior parietal cortex only ($r_s = 0.527$, $p = 0.003$). The illusion subjective characteristics were correlated to the emotional response, and only some of those showed a weak correlation with neurophysiological indicators. EEG and NIRS are complementary, rather than mutually exclusive, when used to study the mirror illusion resulting from the multi-level network organization of brain processes.

Keywords: mirror illusion, mirror visual feedback, electroencephalography, near-infrared spectroscopy, cerebral cortex, neurophysiological markers

Funding: the study was conducted under the State Assignment of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (No. 125022602910-2).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the study participants for their contribution to the scientific knowledge development.

Author contribution: Mokienko OA — research design, analysis of the results, manuscript writing; Bobrov PD — data analysis, manuscript writing; Soloveva AA — experimental procedure, analysis of the results; Isaev MR, Kerchanin YaV — data analysis; Ratnikova VYu, Kataitsev VA — experimental procedure; Shagina ED — research design, discussion; Nikishina VB — research conceptualization, discussion.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Clinical Psychology and Social Work, Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 28 dated 23 October 2024). All subjects signed the informed consent to take part in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olesya A. Mokienko
Ostrovityanova, 1, stroenie 1, Moscow, 117997, Russia; o.mokienko@ihna.ru

Received: 29.09.2025 **Accepted:** 16.10.2025 **Published online:** 28.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.052

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/>).

Иллюзия, вызванная зеркальной визуальной обратной связью, или зеркальная иллюзия (ЗИ), представляет собой нейрофизиологический феномен, при котором визуальное восприятие движений отраженной в зеркале конечности создает ощущение соответствующих движений в контралатеральной конечности, расположенной за зеркалом или отсутствующей [1, 2].

Показано, что зеркальная визуальная обратная связь активирует систему зеркальных нейронов и двигательные структуры головного мозга в ипсилатеральном по отношению к активной руке полушарии, стимулируя процессы нейропластичности [2, 3], а также способствует восстановлению межполушарного функционального баланса [4, 5]. Эти физиологические механизмы послужили обоснованием зеркальной терапии — терапевтического применения ЗИ при ряде хронических неврологических патологий. Клиническая эффективность зеркальной терапии установлена при постампуточном фантомном болевом синдроме [1, 6, 7] и постинсультном гемипарезе [8–10]. Есть данные об эффективности метода при комплексном региональном болевом синдроме [11–14] и функциональных двигательных расстройствах [15]. В настоящее время идет поиск новых протоколов зеркальной терапии, направленных на повышение ее эффективности, включая такой подход, как поэтапное представление движения (Graded Motor Imagery) [16].

Электрофизиологические показатели активности головного мозга, сопровождающей ЗИ, были изучены у здоровых лиц и пациентов с помощью электроэнцефалографии (ЭЭГ) [5, 17, 18], транскраниальной магнитной стимуляции [19, 20] и магнитной энцефалографии [21, 22], а показатели гемодинамической активности — с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии [4, 23] и ближней инфракрасной спектроскопии (БИКС) [24, 25]. Однако не описано исследований, в которых электрофизиологические и гемодинамические показатели регистрировались совместно. Мы ожидаем, что одновременная регистрация ЭЭГ и БИКС позволит лучше изучить физиологию ЗИ и сравнить информативность двух методов в отношении выявления ее коррелятов. Кроме того, нейрофизиология ЗИ при сенсорной стимуляции остается практически неизученной областью.

Цель настоящего исследования — определить нейрофизиологические корреляты ЗИ у здоровых людей с помощью одновременной регистрации активности головного мозга методами ЭЭГ и БИКС во время зеркальной процедуры с совершением движений и тактильной стимуляцией.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Участники исследования

Исследование проводили на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России. Критерии включения: наличие подписанного добровольного информированного согласия; возраст 18–80 лет; любой пол; праворукость по Эдинбургскому опроснику мануальной асимметрии (балл выше 40). Критерии исключения: несогласие принять участие в исследовании; прием на момент исследования лекарственных препаратов, воздействующих на центральную нервную систему; наличие острых заболеваний или обострения хронических; наличие хронического болевого синдрома и инвалидизирующих состояний (в т. ч. ампутаций); наличие серьезных проблем со

зрением, препятствующих увидеть отражение конечности в зеркале; наличие заболеваний кожных покровов в области головы, добровольное желание выбыть из исследования; ухудшение самочувствия в процессе исследования.

В исследование было включено 30 здоровых добровольцев, 12 мужчин и 18 женщин, медиана возраста 21 [20,0; 23,0] лет, все правши. Все участники завершили исследование, данные представлены по всей выборке ($n = 30$).

Процедура исследования

Участники исследования методом жребия были распределены в одну из двух групп: с активной правой или активной левой рукой. Активной считали руку, которая размещалась перед зеркалом и в процессе эксперимента двигалась либо подвергалась сенсорным воздействиям (рис. 1А). В группу с активной левой рукой попало 18 человек, с активной правой рукой — 12 человек.

Экспериментальные процедуры проводили в электрически экранированной и звукоизолированной камере (ООО «Нейроиконика Ассистив», Россия, модель ЭК-1). В процессе эксперимента участнику на голову надевали шапочку, на которой были установлены 21 ЭЭГ-электрод, 10 источников и 10 детекторов БИКС. Под каждый ЭЭГ-электрод был нанесен проводящий гель. Процедура исследования состояла из трех блоков: 1) синхронное движение двух рук без зеркала; 2) имитация зеркальной терапии с двигательной парадигмой; 3) имитация зеркальной терапии с сенсорной стимуляцией. После второго и третьего блоков эксперимента участнику предлагалось заполнить опросник для оценки субъективных характеристик ЗИ.

В ходе первого блока эксперимента участник выполнял бимануальное синхронное движение «кулак-ребро-ладонь» (рис. 1Б) 20 раз по звуковому сигналу с 10-секундными интервалами.

Во втором блоке перед участником исследования устанавливали зеркало так, чтобы в нем отражалась активная рука, при этом вторая рука находилась за зеркалом в расслабленном состоянии. Участник эксперимента выполнял движения «кулак-ребро-ладонь» только активной рукой 20 раз с 10-секундными

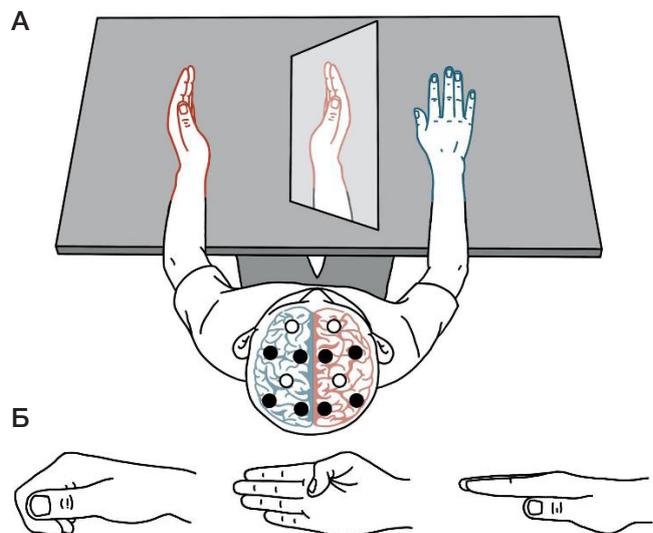


Рис. 1. А. Схема экспериментальной установки: расположение участника, зеркала и рук во время второго и третьего блоков эксперимента. Б. Движения «кулак-ребро-ладонь»

интервалами по звуковому сигналу, фокусируя взгляд на отражении движущейся руки в зеркале.

В третьем блоке исследователь проводил сенсорную стимуляцию активной руки участника. Стимуляцию тупой иглой осуществляли от середины предплечья до кончика среднего пальца, стимуляцию кистью — путем касания середины предплечья и проведения кисти до кончика среднего пальца без отрыва от руки. Интенсивность стимуляции тупой иглой была предварительно откалибрована экспериментатором и установлена на уровне, обеспечивающем комфортное тактильное ощущение без болевых или дискомфортных проявлений. Каждое воздействие включало последовательную стимуляцию сначала иглой, затем сразу же кистью, всего 20 раз. Между воздействиями делали 10-секундный перерыв. Вторая рука находилась за зеркалом в расслабленном состоянии, в то время как участник наблюдал в зеркале за отражением стимулируемой конечности.

Далее термины «контралатерально» и «ипсилатерально» при обозначении латерализации источников активности в головном мозге использованы по отношению к активной руке. На этапе бимануального движения активной условно обозначена рука, которая выполняет движения во втором и третьем блоках эксперимента.

Оценка субъективных характеристик зеркальной иллюзии

После второго и третьего блоков участники оценивали ЗИ по 10-балльной шкале по следующим параметрам:

– яркость иллюзии: «У меня возникло ощущение движения в отражаемой в зеркале руке» (второй блок) или «У меня возникли ощущения прикосновения в отражаемой руке» (третий блок);

– принадлежность: «Я чувствовал, что рука в зеркале — часть моего тела, а не просто отражение другой руки» (второй и третий блоки);

– агентность: «Мне казалось, что я могу напрямую контролировать движения руки в зеркале» (второй блок).

Дополнительно участники указывали скорость наступления ЗИ: сразу или в первые секунды стимуляции, в первой, второй, третьей или четвертой четверти процедуры.

После завершения трех блоков эксперимента участники оценивали интенсивность эмоциональной реакции, связанной с ЗИ, по пяти категориям: удивление, интерес, восторг, тревога и спокойствие (отсутствие выраженной эмоциональной реакции). Участникам предлагалось оценить выраженность каждой эмоции от 0 (полностью отсутствует) до 10 (максимальная интенсивность).

Опросник был разработан специально для данного исследования.

Регистрация сигналов активности головного мозга

ЭЭГ регистрировали при помощи прибора NeoRec Cap 21 («Медицинские компьютерные системы», Россия). Использовали 21 отведение: Fp1, Fp2, F3, F4, C3, C4, P3, P4, O1, O2, F7, F8, C7, C8, P7, P8, Cp5, Cp6, Fz, Cz, Pz. В качестве референта использовали отведение Afz. Частота дискретизации: 250 Гц. Фильтрацию сигнала при регистрации не производили. ЭЭГ-записи были получены для всех 30 участников эксперимента, по одной записи на каждый блок.

Для регистрации метаболической активности мозга использовали спектрометр ближнего инфракрасного диапазона Photon Cap C20 (CortiVision, Польша) с 10 источниками и 10 детекторами. Из всех пар источник-детектор были выбраны 28 каналов, соответствовавших позициям C5h, Fcc3, Ccp3, C3h, Ccp1, Fcc1, C1h, Fccz, Fc1h, Ccpz, C2h, Ccp2, Cp2h, Fcc2, C4h, Fcc4, Ccp4, C6h, Cp1h, Cppz, P1h, P2h, Ppoz, Fc2h, Ffcz, F2h, F1h, Afz системы 10–5 (рис. 2). Частота дискретизации БИКС составляла около 5 Гц и приводилась к 5 Гц при помощи линейной интерполяции сигнала на основе временных

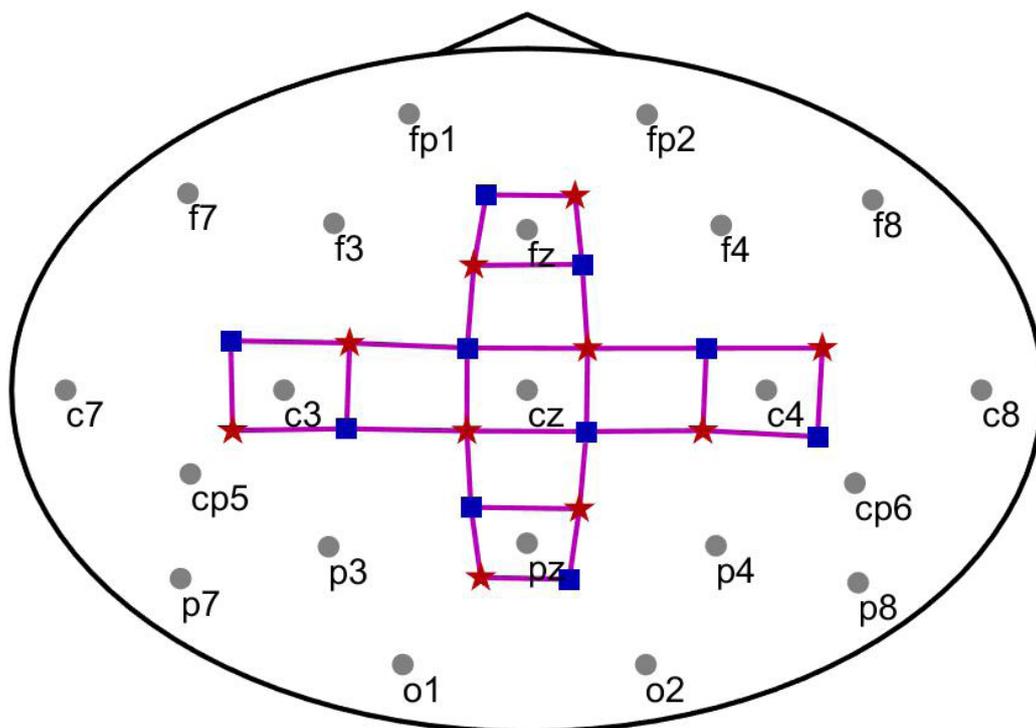


Рис. 2. Схема расположения сенсоров. Кругами обозначены ЭЭГ-электроды, прямоугольниками — оптоды — детекторы БИКС, звездочками — оптоды — источники БИКС; соединительные линии отображают пары источник-детектор, формирующие каналы БИКС

меток, посылаемых прибором. БИКС-записи были получены для 29 участников эксперимента, у одного участника запись БИКС не сохранилась.

Оба устройства передавали данные по протоколу Lab Streaming Layer при помощи ПО, предоставленного изготовителями. Для ЭЭГ это NeoRec (версия 1.6.19830, «Медицинские компьютерные системы», Россия), а для БИКС — CortiView (v1.11.5, CortiVision, Польша). Синхронизацию и запись данных осуществляли при помощи собственного скрипта в PsychoPy (v2022.1.1, Open Science Tools Ltd, Великобритания).

Регистрация движений руки или сенсорного воздействия

Движения рук участника и действия экспериментатора регистрировали видеочамерой (CBR, Китай), модель CW 870FHD, разрешение: 640 × 480, гор. FOV:75°, частота: 10 fps. Скрипт, использовавшийся для синхронной записи БИКС и ЭЭГ, приписывал сохраняемым отсчетам номер текущего кадра. Видеозаписи анализировали покадрово. Для блоков с бимануальными движениями или движениями руки с зеркалом отмечали следующие этапы: начало движения, полное сжатие в кулак, полное раскрытие ладони, касание стола ладонью, полное прекращение движений. Для блоков со стимуляцией — начало движения руки экспериментатора, первое прикосновение твердым предметом, окончание последнего прикосновения твердым предметом, начало касания кисточкой, отрыв кисточки от руки, завершение движения руки экспериментатора. На основании выбранных кадров были размечены записи ЭЭГ и БИКС: в качестве начала события брали первый отсчет данных, соответствующий отмеченному кадру.

Обработка сигналов активности головного мозга

Данные ЭЭГ и БИКС обрабатывали в среде MATLAB 2023b. Для фильтрации ЭЭГ применяли двунаправленный режекторный фильтр, подавляющий наводку 50 Гц, а затем однонаправленный КИХ-фильтр с полосой пропускания 0,5–40 Гц. Задержка полосной фильтрации компенсировалась сдвигом отсчетов. Для выделения артефактов анализировали 200 мс эпохи сигнала. Если на каком-либо из каналов доля отсчетов, выходящих за пределы ±200 микровольт, превышала 1%, то эпоха отбрасывалась. Только в 3 из 60 записях доля таких эпох составила 0,5–0,8%, для остальных она была значительно меньше. Записи каждого участника объединяли после фильтрации, затем проводили разложение полученного сигнала на независимые компоненты при помощи собственной реализации алгоритма AMICA [26]. На основании критериев, описанных ранее [27], были выбраны компоненты, отражающие активность в первичной сенсомоторной коре левого и правого полушарий (источники мю-ритма), дополнительной моторной области и в задней теменной коре/предклинье. Если компоненты указанного типа не удавалось идентифицировать, то для поиска их активности применяли метод формирования луча (LCMV beamforming) на основе усредненных топографических карт компонент данного типа.

Для выбранных компонент вычисляли степень десинхронизации ритмической активности в альфа-диапазоне (8–13 Гц) при совершении движений и стимуляции. Для этого применяли фильтрацию при помощи однонаправленного КИХ-фильтра с компенсацией сдвига

с последующим преобразованием Гильберта и вычислением абсолютных значений. Степень десинхронизации вычисляли как:

$$ERD = (A_{rest} - A_{task}) / (A_{rest} + A_{task}),$$

где A_{rest} — средняя амплитуда в окне (–6, –2) с перед началом движения для двигательных проб и перед началом движения руки экспериментатора для проб со стимуляцией, A_{task} — средняя амплитуда сигнала на отрезке от начала движения до его окончания для блоков с движениями или на отрезке от первого до последнего прикосновения твердым или мягким предметом для блоков со стимуляцией.

Сигналы БИКС в виде зарегистрированных интенсивностей излучения на двух длинах волн пересчитывали в концентрации окси- (HbO) и дезоксигемоглобина (HbR). К полученным данным применяли фильтр с полосой пропускания 0,002–0,09 Гц. Из каждой сессии выделяли 10-секундные отрезки с гемодинамическими откликами. Для отрезков с бимануальными движениями или движениями руки с зеркалом началом считали начало движения, для блоков со стимуляцией — первое прикосновение твердым предметом. Из каждого отрезка вычитали среднее значение сигнала за предстоящие отрезку 5 с записи. Величину гемодинамического ответа рассчитывали, как усредненное по всем отрезкам и по четырем каналам БИКС данной области значение отклика. Рассматривали четыре области, соответствующие первичной сенсомоторной коре левого (каналы БИКС в условных позициях C5h, Fcc3, Ccp3, C3h) и правого полушарий (C4h, Fcc4, Ccp4, C6h), источникам в дополнительной моторной области (Ffcz, F2h, F1h, Affz) и в задней теменной коре/предклинье (Cpzz, P1h, P2h, Ppoz).

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Для проверки гипотезы о нормальности распределения выборки использовали тест Шапиро–Уилка. Для корреляционного анализа использовали коэффициент корреляции Спирмена (rs), для сравнения связанных выборок — критерий Уилкоксона. Критический уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Количественные данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Степень десинхронизации мю-ритма

Из рассматриваемых источников латеральность по данным ЭЭГ удалось определить только для источников мю-ритма, т. е. тех, которые локализованы в первичных сенсомоторных областях. При бимануальном движении наблюдали сопоставимую степень десинхронизации мю-ритма над обоими полушариями. Аналогичную симметричную десинхронизацию мю-ритма регистрировали при движении одной рукой перед зеркалом на фоне неактивного состояния второй руки — как над контралатеральным, так и над ипсилатеральным полушарием относительно активной конечности (табл. 1). В отличие от этих условий, сенсорная стимуляция активной руки вызывала значимо более выраженную десинхронизацию мю-ритма над контралатеральным полушарием (табл. 1).

Таблица 1. Степень подавления мио-ритма при разных состояниях

Состояние	Контралатерально, %	Ипсилатерально, %	<i>p</i>
Бимануальное движение	10,89 [4,59; 18,12]	8,72 [3,71; 16,02]	0,544
Движение одной рукой (активной)	9,71 [2,82; 16,20]	5,64 [2,84; 12,13]	0,797
Тактильная стимуляция	14,57 [6,39; 20,17]	5,49 [-5,00; 8,46]	< 0,001

Таблица 2. Величина гемодинамического ответа при разных состояниях

Состояние	HbO, нмоль/л			HbR, нмоль/л		
	Контралатерально	Ипсилатерально	<i>p</i>	Контралатерально	Ипсилатерально	<i>p</i>
Бимануальное движение	6,92 [-0,21; 28,04]	7,02 [0,36; 28,61]	0,393	-2,66 [-7,80; -0,63]	-2,48 [-5,69; -0,13]	0,393
Движение одной рукой	6,88 [3,07; 17,20]	4,91 [0,11; 14,59]	0,094	-0,68 [-4,32; 0,86]	-0,52 [-2,73; 0,80]	0,905
Тактильная стимуляция	-0,76 [-16,59; 2,30]	-0,45 [-15,53; 6,18]	0,77	-0,09 [-1,02; 2,37]	0,27 [-1,19; 2,10]	0,787

Гемодинамический отклик

Во всех экспериментальных блоках регистрировалась сопоставимая выраженность гемодинамического ответа в обоих полушариях головного мозга (табл. 2). Данная закономерность проявлялась в отношении концентрации как HbO, так и HbR. При тактильной стимуляции возникали атипичные изменения гемодинамических показателей: концентрация HbO в период активной стимуляции снижалась, тогда как концентрация HbR снижалась в меньшей степени или повышалась (табл. 2).

Корреляция количественных характеристик ЭЭГ- и БИКС-сигналов

Выраженность десинхронизации ритмической активности в альфа-диапазоне также коррелировала с изменением концентрации HbO ($r_s = 0,527$, $p = 0,003$) во время движения одной рукой перед зеркалом в области задней теменной коры. Других статистически значимых корреляций между степенью десинхронизации и показателями гемодинамического ответа для одинаковых экспериментальных состояний выявлено не было.

Психометрические характеристики зеркальной иллюзии

Степень субъективной выраженности ЗИ была сопоставима при движении рукой и сенсорной стимуляции по таким характеристикам, как яркость иллюзии и чувство принадлежности (табл. 3). Большинство участников отметили наступление ЗИ в течение первой половины соответствующего блока: 53% во втором блоке и 79% в третьем блоке (табл. 3).

Анализ корреляций между субъективными характеристиками ЗИ и степенью десинхронизации либо изменением концентрации HbO или HbR при движении одной рукой перед зеркалом позволил выявить только слабую корреляцию яркости иллюзии со степенью десинхронизации ипсилатерального мио-ритма ($r_s = 0,370$, $p = 0,044$) и изменением концентрации HbO в области дополнительной моторной коры ($r_s = 0,425$, $p = 0,022$), а также слабую корреляцию чувства владения виртуальной конечностью с изменением концентрации HbO ($r_s = 0,392$, $p = 0,036$) и HbR ($r_s = -0,413$, $p = 0,026$) в области дополнительной моторной коры. Других статистически значимых корреляций для этого задания не обнаружено.

Таблица 3. Субъективные характеристики зеркальной иллюзий при одностороннем движении или сенсорной стимуляции перед зеркалом

Характеристика иллюзии	Состояние			
	Движение рукой	Сенсорная стимуляция	<i>p</i>	
Яркость иллюзии, 0–10 баллов	4,5 [1,0; 7,0]	2,0 [0,0; 6,0]	0,23	
Принадлежность, 0–10 баллов	6,0 [3,0; 8,0]	4,0 [3,0; 8,0]	0,192	
Агентность, 0–10 баллов	4,5 [2,0; 7,0]	–	–	
Скорость наступления, человек*	Сразу	8	9	–
	Первая четверть	5	5	
	Вторая четверть	3	9	
	Третья четверть	6	3	
	Четвертая четверть	3	1	
	Не наступила	5	2	
Эмоциональная реакция, 0–10 баллов	Удивление	6,0 [3,0; 7,0]		–
	Интерес	8,0 [6,0; 8,0]		
	Восторг	3,0 [1,0; 7,0]		
	Тревога	1,0 [0,0; 5,0]		
	Спокойствие	7,5 [4,0; 9,0]		

Примечание: * — в одной анкете не была отмечена скорость наступления иллюзии в блоке с сенсорной стимуляцией.

Таблица 4. Субъективные характеристики зеркальной иллюзии при одностороннем движении или сенсорной стимуляции перед зеркалом

Характеристика иллюзии	Эмоциональная реакция				
	Удивление	Интерес	Восторг	Тревога	Спокойствие
Яркость иллюзии – движение рукой	$r_s = 0,523$ $p = 0,003$	$r_s = 0,378$ $p = 0,039$	$r_s = 0,469$ $p = 0,008$	$r_s = 0,404$ $p = 0,027$	$r_s = -0,199$ $p = 0,291$
Принадлежность – движение рукой	$r_s = 0,568$ $p = 0,001$	$r_s = 0,482$ $p = 0,007$	$r_s = 0,551$ $p = 0,002$	$r_s = 0,401$ $p = 0,028$	$r_s = -0,305$ $p = 0,101$
Агентность – движение рукой	$r_s = 0,626$ $p < 0,001$	$r_s = 0,502$ $p = 0,005$	$r_s = 0,588$ $p < 0,001$	$r_s = 0,391$ $p = 0,032$	$r_s = -0,305$ $p = 0,101$
Яркость иллюзии – сенсорная стимуляция	$r_s = 0,227$ $p = 0,226$	$r_s = 0,231$ $p = 0,217$	$r_s = 0,303$ $p = 0,104$	$r_s = -0,108$ $p = 0,570$	$r_s = 0,268$ $p = 0,152$
Принадлежность – сенсорная стимуляция	$r_s = 0,487$ $p = 0,006$	$r_s = 0,410$ $p = 0,025$	$r_s = 0,499$ $p = 0,005$	$r_s = 0,401$ $p = 0,028$	$r_s = -0,173$ $p = 0,358$

При сенсорной стимуляции руки, расположенной перед зеркалом, статистически значимых корреляций между субъективными характеристиками ЗИ и степенью десинхронизации мю-ритма (как контра-, так и ипсилатерально) не выявлено.

Большинство субъективных характеристик ЗИ достоверно положительно коррелировало с выраженностью эмоциональной реакции на данную иллюзию (табл. 4).

Выраженность интереса к возникающим иллюзорным ощущениям отрицательно коррелировала со степенью десинхронизации мю-ритма в контралатеральном полушарии ($r_s = -0,471, p = 0,009$) и в области дополнительной моторной коры ($r_s = -0,419, p = 0,021$), а также с изменением концентрации HbO в области дополнительной моторной коры ($r_s = -0,444, p = 0,016$) во время движения рукой перед зеркалом. Других статистически значимых корреляций между выраженностью эмоциональных реакций и количественными показателями ЭЭГ- или БИКС-ответа не выявлено.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании при совместной регистрации ЭЭГ и БИКС-сигналов головного мозга во время предъявления зеркальной визуальной обратной связи здоровым добровольцам было продемонстрировано, что при движении одной рукой с зеркалом активируются оба полушария головного мозга, аналогично бимануальному движению, что можно оценить как по электрофизиологическим, так и по гемодинамическим показателям. При тактильной стимуляции методом ЭЭГ была зарегистрирована активация только контралатерального полушария относительно стимулируемой конечности, тогда как методом БИКС — сопоставимые изменения гемодинамики в обоих полушариях, однако атипичные в отношении направления изменения концентраций HbO и HbR. Большинство показателей электрофизиологического и гемодинамического ответа не коррелировало между собой.

В других работах билатеральная активация головного мозга при выполнении движения с визуальной зеркальной обратной связью была показана с помощью ЭЭГ [17, 18] и с помощью БИКС [24, 25] по отдельности. Движение одной рукой перед зеркалом сопровождалось в большей степени активацией дополнительной моторной [24, 25], верхней или нижней теменной [18, 24], премоторной [18, 25] и первичной соматомоторной [18] коры ипсилатерального по отношению к активной руке полушария. Указанные области включают структуры системы зеркальных нейронов, но ими не ограничиваются. Одно из объяснений механизма

возникновения ЗИ — блокада тормозных процессов в ипсилатеральных (т. е. контралатеральных зеркальному отображению) фронтальных и теменных ассоциативных сенсомоторных областях коры, приводящая к растормаживанию указанных областей и развитию иллюзии движения неподвижной конечности за зеркалом [18]. Возможно, это происходит вследствие индуцированного зеркальной обратной связью сдвига активации корковых структур в направлении ипсилатерального полушария, что способствует снижению межполушарного дисбаланса при одностороннем движении [5].

При изучении изменения ЭЭГ при тактильной стимуляции с зеркалом [28] была показана более сильная активация на стороне, контралатеральной стимулируемой руке, с чем согласуются и наши данные. При этом была также показана активация вторичной сенсомоторной коры и областей, входящих в систему зеркальных нейронов, в ипсилатеральном полушарии, что позволяло ожидать изменения амплитуды мю-ритма на ипсилатеральной стороне в зависимости от выраженности иллюзии, однако их не было обнаружено. Наблюдаемые нами изменения концентраций HbO и HbR могут отражать так называемый «сенсомоторный парадокс», заключающийся в невозможности четко определить направление гемодинамического ответа на тактильную стимуляцию и обусловленный сложностью паттерна одновременной активации и деактивации различных нейронных популяций [29]. Данный феномен представляет серьезную методологическую проблему при использовании БИКС для изучения мозговой активности в рамках зеркальной парадигмы, особенно с учетом влияния параметров стимуляции и вовлечения множественных сенсорных модальностей [30]. Можно предположить, что для дальнейших исследований и объяснения атипичных изменений гемодинамических показателей при сенсорной стимуляции с зеркальной обратной связью необходимы более простые протоколы стимуляции, например, применение только твердого или только мягкого предмета.

В данном исследовании не выявлено корреляции между большинством количественных показателей ЭЭГ и БИКС для идентичных экспериментальных условий. Корреляция между степенью десинхронизации ритма в альфа-диапазоне и увеличением концентрации HbO наблюдалась только в области задней теменной коры при движении рукой перед зеркалом. В доступной литературе не удалось обнаружить другие работы по совместной регистрации электрофизиологических и гемодинамических показателей активности головного мозга во время экспериментов с зеркальной визуальной обратной связью. В дальнейшем требуется анализ дополнительных показателей, например,

индексов латерализации или коннективности. В целом, можно заключить, что ЭЭГ и БИКС могут дополнять, но не заменять друг друга в комплексном исследовании нейрофизиологических механизмов ЗИ.

Отдельные субъективные характеристики ЗИ слабо коррелировали со степенью десинхронизации ипсилатерального мю-ритма и показателями активации дополнительной моторной коры. Однако большинство субъективных характеристик ЗИ не коррелировали с электрофизиологическими и гемодинамическими показателями активности коры головного мозга, но демонстрировали значимую корреляцию с выраженностью эмоциональной реакции на возникающую иллюзию. Диссоциация между объективными нейрофизиологическими показателями и субъективными переживаниями иллюзии может свидетельствовать о многоуровневой или сетевой организации формирования иллюзорного опыта, а не активности изолированных корковых областей [18]. Эмоциональная реакция на иллюзию может служить интегративным показателем, отражающим не только перцептивные аспекты, но и личностные особенности участников, их готовность принять иллюзорный опыт и общую эмоциональную реактивность.

Выявленная билатеральная активация первичных сенсомоторных областей при движении одной рукой перед зеркалом имеет потенциальное клиническое значение для оптимизации протоколов зеркальной терапии. Полученные данные обосновывают целесообразность применения двигательной парадигмы зеркальной терапии для пациентов с постинсультным гемипарезом, поскольку она обеспечивает активацию моторных структур ипсилатерального полушария, что может способствовать восстановлению межполушарного функционального баланса. Выявленная тесная связь субъективных характеристик зеркальной иллюзии с эмоциональной реакцией предполагает, что позитивный эмоциональный отклик пациента на первых сеансах может служить предиктором эффективности терапии, отражая степень вовлеченности пациента в реабилитационный процесс. Продемонстрированная возможность комбинации ЭЭГ и БИКС открывает перспективы для разработки гибридных технологий нейробиоуправления. Это позволяет прогнозировать эффективность лечения и индивидуализировать реабилитационные программы на основе нейрофизиологических биомаркеров, в том

числе для пациентов с ограничениями к традиционной зеркальной терапии, например, при двусторонней ампутации с фантомным болевым синдромом.

Данное исследование имеет следующие ограничения: отсутствие технической возможности фиксации участниками времени возникновения ЗИ (например, с помощью педали); отсутствие экспериментального блока с движением одной руки без зеркала в качестве контрольного условия; применение упрощенного опросника восприятия ЗИ. Однако ограничения не влияют на основные выводы по результатам исследования. Следует также отметить, что в условиях данного эксперимента невозможно полностью разделить эмоциональную реакцию на зеркальную иллюзию и реакцию новизны на необычный сенсорный опыт, поскольку оценку проводили однократно, без повторных измерений при привыкании к стимулу. Некоторые из фиксируемых эмоциональных состояний (удивление, интерес) могут частично отражать ориентировочный рефлекс на новый перцептивный опыт. Дифференциация этих компонентов может быть предметом будущих лонгитюдных исследований.

ВЫВОДЫ

Таким образом, движение рукой перед зеркалом сопровождается билатеральной активацией первичных сенсомоторных областей обоих полушарий. Корреляции между ЭЭГ и БИКС-показателями выявлены лишь в задней теменной коре, из чего следует, что ЭЭГ и БИКС дополняют, но не заменяют друг друга при изучении ЗИ. Субъективные характеристики иллюзии коррелировали с эмоциональной реакцией, и лишь отдельные из них слабо коррелировали с нейрофизиологическими показателями, что соответствует концепции о многоуровневой сетевой организации механизмов формирования ЗИ. В последующих работах целесообразно провести совместную регистрацию ЭЭГ и БИКС во время проведения зеркальной терапии пациентам с постампутационной фантомной болью или постинсультным гемипарезом, а также оценить динамику выявленных нейромаркеров ЗИ на фоне курса зеркальной терапии. Полученные в таких исследованиях данные можно сравнить с нормой и учесть при разработке технологий нейробиоуправления с обратной связью по ЭЭГ- и БИКС-сигналам для коррекции указанных патологий.

Литература

1. Ramachandran VS, Rogers-Ramachandran D. Synaesthesia in phantom limbs induced with mirrors. *Proc Biol Sci.* 1996; 263: 377–86.
2. Deconinck FJA, Smorenburg ARP, Benham A, Ledebt A, Feltham MG, Savelsbergh GJP. Reflections on Mirror Therapy: A Systematic Review of the Effect of Mirror Visual Feedback on the Brain. *Neurorehabilitation and Neural Repair.* 2015; 29: 349–61.
3. Zhang JJQ, Fong KNK, Welage N, Liu KPY. The Activation of the Mirror Neuron System during Action Observation and Action Execution with Mirror Visual Feedback in Stroke: A Systematic Review. *Neural Plast.* 2018; 2018: 2321045.
4. Zhang K, Ding L, Wang X, et al. Mirror therapy reduces excessive variability of motor network in stroke patients: a randomized controlled trial. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2025; 61: 184–94.
5. Zhuang J, Lei X, Guo X, Ding L, Jia J. Motor and parietal cortex activity responses to mirror visual feedback in patients with subacute stroke: An EEG study. *Clin Neurophysiol Pract.* 2025; 10: 12–21.
6. Xie H-M, Zhang K-X, Wang S, et al. Effectiveness of Mirror Therapy for Phantom Limb Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2022; 103: 988–97.
7. Мокиенко О. А., Ивкина М. В. Методы лечения фантомной боли с позиций доказательной медицины. *Российский неврологический журнал.* 2023; 28(6): 11–18.
8. Thieme H, Morkisch N, Mehrholz J, et al. Mirror therapy for improving motor function after stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018; 7: CD008449.
9. Jaafar N, Che Daud AZ, Ahmad Roslan NF, Mansor W. Mirror Therapy Rehabilitation in Stroke: A Scoping Review of Upper Limb Recovery and Brain Activities. *Rehabil Res Pract.* 2021; 2021: 9487319.
10. Kim H, Lee E, Jung J, Lee S. Utilization of Mirror Visual Feedback

- for Upper Limb Function in Poststroke Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vision* (Basel). 2023; 7.
11. McCabe CS, Haigh RC, Ring EFJ, Halligan PW, Wall PD, Blake DR. A controlled pilot study of the utility of mirror visual feedback in the treatment of complex regional pain syndrome (type 1). *Rheumatology* (Oxford). 2003; 42: 97–101.
 12. Vladimir Tichelaar YIG, Geertzen JHB, Keizer D, Paul van Wilgen C. Mirror box therapy added to cognitive behavioural therapy in three chronic complex regional pain syndrome type I patients: a pilot study. *Int J Rehabil Res*. 2007; 30: 181–8.
 13. Pervane Vural S, Nakipoglu Yuzer GF, Sezgin Ozcan D, Demir Ozbudak S, Ozigirgin N. Effects of Mirror Therapy in Stroke Patients With Complex Regional Pain Syndrome Type 1: A Randomized Controlled Study. *Arch Phys Med Rehabil*. 2016; 97: 575–81.
 14. Machač S, Chasáková L, Kakawand S, et al. Mirror visual feedback as therapeutic modality in unilateral upper extremity complex regional pain syndrome type I: randomized controlled trial. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2024; 60: 280–91.
 15. Bullock K, Won AS, Bailenson J, Friedman R. Virtual Reality-Delivered Mirror Visual Feedback and Exposure Therapy for FND: A Midpoint Report of a Randomized Controlled Feasibility Study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2020; 32: 90–4.
 16. Limakatso K, Cashin AG, Williams S, Devonshire J, Parker R, McAuley JH. The Efficacy of Graded Motor Imagery and Its Components on Phantom Limb Pain and Disability: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Pain*. 2023; 7: 2188899.
 17. Rizzo M, Petrini L, Del Percio C, Lopez S, Arendt-Nielsen L, Babiloni C. Mirror visual feedback during unilateral finger movements is related to the desynchronization of cortical electroencephalographic somatomotor alpha rhythms. *Psychophysiology*. 2022; 59: e141116.
 18. Rizzo M, Del Percio C, Petrini L, Lopez S, Arendt-Nielsen L, Babiloni C. Cortical sources of electroencephalographic alpha rhythms related to the anticipation and experience of mirror visual feedback-induced illusion of finger movements. *Psychophysiology*. 2023; 60: e14281.
 19. Norris TA, Augenstein TE, Rodriguez KM, Clafflin ES, Krishnan C. Shaping corticospinal pathways in virtual reality: effects of task complexity and sensory feedback during mirror therapy in neurologically intact individuals. *J Neuroeng Rehabil*. 2024; 21: 154.
 20. Yarossi M, Manuweera T, Adamovich SV, Tunik E. The Effects of Mirror Feedback during Target Directed Movements on Ipsilateral Corticospinal Excitability. *Front Hum Neurosci*. 2017; 11: 242.
 21. Tai R-Y, Zhu J-D, Chen C-C, Hsieh Y-W, Cheng C-H. Modulation of Functional Connectivity in Response to Mirror Visual Feedback in Stroke Survivors: An MEG Study. *Brain Sci*. 2021; 11.
 22. Cheng C-H, Lin S-H, Wu C-Y, Liao Y-H, Chang K-C, Hsieh Y-W. Mirror Illusion Modulates M1 Activities and Functional Connectivity Patterns of Perceptual-Attention Circuits During Bimanual Movements: A Magnetoencephalography Study. *Front Neurosci*. 2019; 13: 1363.
 23. Wang J, Fritzsche C, Bernarding J, et al. Cerebral activation evoked by the mirror illusion of the hand in stroke patients compared to normal subjects. *NeuroRehabilitation*. 2013; 33: 593–603.
 24. Bai Z, Fong KNK, Zhang J, Hu Z. Cortical mapping of mirror visual feedback training for unilateral upper extremity: A functional near-infrared spectroscopy study. *Brain Behav*. 2020; 10: e01489.
 25. Tsou M-H, Chen P-Y, Hung Y-T, Lim Y-W, Huang S-L, Liu Y-C. Comparison of Brain Activation Between Different Modes of Motor Acquisition: A Functional Near-Infrared Study. *Brain Behav*. 2025; 15: e70238.
 26. Delorme A, Palmer J, Onton J, Oostenveld R, Makeig S. Independent EEG sources are dipolar. *PLoS One*. 2012; 7: e30135.
 27. Frolov A, Bobrov P, Biryukova E, et al. Using Multiple Decomposition Methods and Cluster Analysis to Find and Categorize Typical Patterns of EEG Activity in Motor Imagery Brain-Computer Interface Experiments. *Front Robot AI*. 2020; 7: 88.
 28. Dubová D, Dvořáčková D, Pavlů D, Pánek D. Cerebral Projection of Mirrored Touch via sLORETA Imaging. *Life* (Basel). 2023; 13. DOI:10.3390/life13051201.
 29. Seiyama A, Seki J, Tanabe HC, et al. Circulatory basis of fMRI signals: relationship between changes in the hemodynamic parameters and BOLD signal intensity. *Neuroimage*. 2004; 21: 1204–14.
 30. Seiyama A, Miura T, Okahashi S, Konishi N, Cassim M. Visual effects on tactile stimulation and its perception: A pilot study using near-infrared spectroscopy. *MethodsX*. 2024; 13: 102849.

References

1. Ramachandran VS, Rogers-Ramachandran D. Synaesthesia in phantom limbs induced with mirrors. *Proc Biol Sci*. 1996; 263: 377–86.
2. Deconinck FJA, Smorenburg ARP, Benham A, Ledebt A, Feltham MG, Savelsbergh GJP. Reflections on Mirror Therapy: A Systematic Review of the Effect of Mirror Visual Feedback on the Brain. *Neurorehabilitation and Neural Repair*. 2015; 29: 349–61.
3. Zhang JJQ, Fong KNK, Welage N, Liu KPY. The Activation of the Mirror Neuron System during Action Observation and Action Execution with Mirror Visual Feedback in Stroke: A Systematic Review. *Neural Plast*. 2018; 2018: 2321045.
4. Zhang K, Ding L, Wang X, et al. Mirror therapy reduces excessive variability of motor network in stroke patients: a randomized controlled trial. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2025; 61: 184–94.
5. Zhuang J, Lei X, Guo X, Ding L, Jia J. Motor and parietal cortex activity responses to mirror visual feedback in patients with subacute stroke: An EEG study. *Clin Neurophysiol Pract*. 2025; 10: 12–21.
6. Xie H-M, Zhang K-X, Wang S, et al. Effectiveness of Mirror Therapy for Phantom Limb Pain: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2022; 103: 988–97.
7. Мокиенко О. А., Ивкина М. В. Методы лечения фантомной боли с позиций доказательной медицины. *Российский неврологический журнал*. 2023; 28(6): 11–18.
8. Thieme H, Morkisch N, Mehrholz J, et al. Mirror therapy for improving motor function after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018; 7: CD008449.
9. Jaafar N, Che Daud AZ, Ahmad Roslan NF, Mansor W. Mirror Therapy Rehabilitation in Stroke: A Scoping Review of Upper Limb Recovery and Brain Activities. *Rehabil Res Pract*. 2021; 2021: 9487319.
10. Kim H, Lee E, Jung J, Lee S. Utilization of Mirror Visual Feedback for Upper Limb Function in Poststroke Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Vision* (Basel). 2023; 7.
11. McCabe CS, Haigh RC, Ring EFJ, Halligan PW, Wall PD, Blake DR. A controlled pilot study of the utility of mirror visual feedback in the treatment of complex regional pain syndrome (type 1). *Rheumatology* (Oxford). 2003; 42: 97–101.
12. Vladimir Tichelaar YIG, Geertzen JHB, Keizer D, Paul van Wilgen C. Mirror box therapy added to cognitive behavioural therapy in three chronic complex regional pain syndrome type I patients: a pilot study. *Int J Rehabil Res*. 2007; 30: 181–8.
13. Pervane Vural S, Nakipoglu Yuzer GF, Sezgin Ozcan D, Demir Ozbudak S, Ozigirgin N. Effects of Mirror Therapy in Stroke Patients With Complex Regional Pain Syndrome Type 1: A Randomized Controlled Study. *Arch Phys Med Rehabil*. 2016; 97: 575–81.
14. Machač S, Chasáková L, Kakawand S, et al. Mirror visual feedback as therapeutic modality in unilateral upper extremity complex regional pain syndrome type I: randomized controlled trial. *Eur J Phys Rehabil Med*. 2024; 60: 280–91.
15. Bullock K, Won AS, Bailenson J, Friedman R. Virtual Reality-Delivered Mirror Visual Feedback and Exposure Therapy for FND: A Midpoint Report of a Randomized Controlled Feasibility Study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2020; 32: 90–4.
16. Limakatso K, Cashin AG, Williams S, Devonshire J, Parker R, McAuley JH. The Efficacy of Graded Motor Imagery and Its Components on Phantom Limb Pain and Disability: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Pain*. 2023; 7: 2188899.

17. Rizzo M, Petrini L, Del Percio C, Lopez S, Arendt-Nielsen L, Babiloni C. Mirror visual feedback during unilateral finger movements is related to the desynchronization of cortical electroencephalographic somatomotor alpha rhythms. *Psychophysiology*. 2022; 59: e14116.
18. Rizzo M, Del Percio C, Petrini L, Lopez S, Arendt-Nielsen L, Babiloni C. Cortical sources of electroencephalographic alpha rhythms related to the anticipation and experience of mirror visual feedback-induced illusion of finger movements. *Psychophysiology*. 2023; 60: e14281.
19. Norris TA, Augenstein TE, Rodriguez KM, Clafin ES, Krishnan C. Shaping corticospinal pathways in virtual reality: effects of task complexity and sensory feedback during mirror therapy in neurologically intact individuals. *J Neuroeng Rehabil*. 2024; 21: 154.
20. Yarossi M, Manuweera T, Adamovich SV, Tunik E. The Effects of Mirror Feedback during Target Directed Movements on Ipsilateral Corticospinal Excitability. *Front Hum Neurosci*. 2017; 11: 242.
21. Tai R-Y, Zhu J-D, Chen C-C, Hsieh Y-W, Cheng C-H. Modulation of Functional Connectivity in Response to Mirror Visual Feedback in Stroke Survivors: An MEG Study. *Brain Sci*. 2021; 11.
22. Cheng C-H, Lin S-H, Wu C-Y, Liao Y-H, Chang K-C, Hsieh Y-W. Mirror Illusion Modulates M1 Activities and Functional Connectivity Patterns of Perceptual-Attention Circuits During Bimanual Movements: A Magnetoencephalography Study. *Front Neurosci*. 2019; 13: 1363.
23. Wang J, Fritzsche C, Bernarding J, et al. Cerebral activation evoked by the mirror illusion of the hand in stroke patients compared to normal subjects. *NeuroRehabilitation*. 2013; 33: 593–603.
24. Bai Z, Fong KNK, Zhang J, Hu Z. Cortical mapping of mirror visual feedback training for unilateral upper extremity: A functional near-infrared spectroscopy study. *Brain Behav*. 2020; 10: e01489.
25. Tsou M-H, Chen P-Y, Hung Y-T, Lim Y-W, Huang S-L, Liu Y-C. Comparison of Brain Activation Between Different Modes of Motor Acquisition: A Functional Near-Infrared Study. *Brain Behav*. 2025; 15: e70238.
26. Delorme A, Palmer J, Onton J, Oostenveld R, Makeig S. Independent EEG sources are dipolar. *PLoS One*. 2012; 7: e30135.
27. Frolov A, Bobrov P, Biryukova E, et al. Using Multiple Decomposition Methods and Cluster Analysis to Find and Categorize Typical Patterns of EEG Activity in Motor Imagery Brain-Computer Interface Experiments. *Front Robot AI*. 2020; 7: 88.
28. Dubová D, Dvořáčková D, Pavlů D, Pánek D. Cerebral Projection of Mirrored Touch via sLORETA Imaging. *Life (Basel)*. 2023; 13. DOI:10.3390/life13051201.
29. Seiyama A, Seki J, Tanabe HC, et al. Circulatory basis of fMRI signals: relationship between changes in the hemodynamic parameters and BOLD signal intensity. *Neuroimage*. 2004; 21: 1204–14.
30. Seiyama A, Miura T, Okahashi S, Konishi N, Cassim M. Visual effects on tactile stimulation and its perception: A pilot study using near-infrared spectroscopy. *MethodsX*. 2024; 13: 102849.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕДКОГО СЛУЧАЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ХРОМОСОМЫ 22 ВСЛЕДСТВИЕ МАТЕРИНСКОЙ ИНТРАХРОМОСОМНОЙ ИНСЕРЦИИ

Д. А. Юрченко , Ж. Г. Маркова, М. С. Петухова, Г. Н. Матющенко, Н. В. Шилова

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

Формирование рекомбинантных хромосом в потомстве носителей инверсий и инсерций представляет собой серьезную проблему клинической генетики в связи с высоким риском рождения детей с хромосомной патологией. Представлен клинический случай. Целью исследования было в ходе молекулярно-цитогенетической диагностики рекомбинантной хромосомы 22 установить структуру и происхождение хромосомного дисбаланса у пациентки с задержкой моторного и психоречевого развития, черепно-лицевыми аномалиями и тугоухостью. При проведении хромосомного микроматричного анализа у пробанда с задержкой психомоторного развития и признаками дисморфогенеза были обнаружены три интерстициальные дупликации: 22q11.21, 22q12.3q13.1 и 22q13.2. FISH-анализ с использованием коммерческих и несерийных ДНК-зондов позволил установить, что у матери пациентки имеется сложная интрахромосомная перестройка: сочетание иницирующей парацентрической инверсии 22q11.21q12.3 и последующей межглычевой инсерции районов 22q11.21 и 22q12.3q13.1 в район ядрышкового организатора 22p12. Соответственно, выявленная у пробанда рекомбинантная хромосома является результатом сегрегации материнской сложной внутривхромосомной перестройки. Полученные результаты подчеркивают диагностическую ценность комплексного цитогеномного подхода для точной идентификации сложных хромосомных нарушений, определения их происхождения и оценки генетических рисков при медико-генетическом консультировании.

Ключевые слова: интрахромосомная инсерция, инверсия, рекомбинантная хромосома 22, FISH, несерийные ДНК-зонды, CNV, дупликация

Финансирование: исследование проведено в рамках темы НИР № 12305220006-7 «Оптимизация молекулярно-(цитогенетических) подходов для верификации и интерпретации клинически значимых вариаций числа копий участков ДНК (CNV)» (#FGFF-2023-0003).

Вклад авторов: Д. А. Юрченко — дизайн исследования, разработка несерийных ДНК-зондов, проведение FISH-диагностики и интерпретация полученных данных, подготовка рукописи; Ж. Г. Маркова — проведение FISH-исследования с коммерческими ДНК-зондами; М. С. Петухова, Г. Н. Матющенко — медико-генетическое консультирование семьи; Н. В. Шилова — концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов, научное редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 4/2 от 19 апреля 2021 г.). Получено добровольное информированное согласие на участие пациентов в научном исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Дарья Александровна Юрченко
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115522, Россия; dashalbv@mail.ru

Статья получена: 16.09.2025 **Статья принята к печати:** 06.10.2025 **Опубликована онлайн:** 26.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.050

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/>).

MOLECULAR CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF A RARE RECOMBINANT CHROMOSOME 22 CAUSED BY A MATERNAL INTRACHROMOSOMAL INSERTION

Yurchenko DA , Markova ZhG, Petukhova MS, Matyushchenko GN, Shilova NV

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

The formation of recombinant chromosomes in the offspring of inversion and insertion carriers constitutes a significant challenge in clinical genetics due to the high risk of chromosomal abnormalities in children. Here, we present a clinical case. The aim of this study was to characterize the structure and origin of a chromosomal imbalance in a female patient presenting with delayed motor and speech development, craniofacial anomalies, and sensorineural hearing loss through molecular cytogenetic analysis of a recombinant chromosome 22. Chromosomal microarray analysis of the proband, who exhibited psychomotor delay and dysmorphic features, revealed three interstitial duplications: 22q11.21, 22q12.3–q13.1, and 22q13.2. Fluorescence in situ hybridization (FISH), using both commercial and homemade DNA probes, demonstrated that the mother carried a complex intrachromosomal rearrangement comprising an initial paracentric inversion of 22q11.21–q12.3, followed by an interstitial insertion of the 22q11.21 and 22q12.3–q13.1 segments into the nucleolar organizer region at 22p12. Accordingly, the recombinant chromosome identified in the proband resulted from meiotic segregation of the maternal complex intrachromosomal inversion and insertion. These findings highlight the diagnostic value of an integrated cytogenomic approach for the precise delineation of complex chromosomal rearrangements, determination of their origin, and assessment of genetic risk in clinical genetic counseling.

Keywords: intrachromosomal insertion, inversion, recombinant chromosome 22, FISH, homemade DNA probes, CNV, duplication

Funding: this research was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (#FGFF-2023-0003).

Author contribution: Yurchenko DA — study design, development of homemade DNA probes, conducting FISH analysis and interpreting the data, manuscript preparation; Markova ZhG — conducting FISH analysis using commercial DNA probes; Petukhova MS and Matyushchenko GN — clinical genetic counseling of the family; Shilova NV — study conception and design, discussion of results, and scientific editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 4/2 dated 19 April 2021). The informed consent for participation in the research study was obtained from the patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Darya A. Yurchenko
Moskvorechye, 1, Moscow, 115522, Russia; dashalbv@mail.ru

Received: 16.09.2025 **Accepted:** 06.10.2025 **Published online:** 26.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.050

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/>).

Рекомбинантные хромосомы (rec) выявляются у потомства носителей таких сбалансированных структурных хромосомных перестроек (ХП), как инверсии и инсерции, и сопровождаются изменением количества генетического материала — вариациями числа копий участков ДНК (copy number variations, CNV) в виде делеций и дупликаций, ассоциированных с аномальным фенотипом [1, 2].

Большинство патогенных микроделеций и микродупликаций представляют собой рекуррентные CNV, возникновение которых связано с особенностями геномной архитектуры и приводит к формированию спорадических случаев хромосомного дисбаланса [3]. В отличие от этого, нерекуррентные CNV могут быть следствием и других механизмов формирования, например, рекомбинационных событий в мейозе I у фенотипически нормальных гетерозиготных носителей инверсий, а также интра- и интерхромосомных инсерций. Межплечевая интрахромосомная инсерция представляет собой сегмент хроматина одного плеча, вставленный в точку разрыва другого плеча [4]. Так, после формирования бивалента между хромосомой с межплечевой инсерцией и ее нормальным гомологом инсертированный сегмент разворачивается таким образом, чтобы обеспечить максимальную степень синапсиса бивалента. Один или любое нечетное число кроссинговеров в центромерном сегменте (часть хромосомы, содержащая центромеру) приведет к образованию рекомбинантных хромосом: одной с дупликацией инсерционного сегмента, а другой с делецией. Гаметы (впоследствии зиготы) с рекомбинантными хромосомами приводят к образованию интерстициальных CNV у потомства (рис. 1).

Вклад сбалансированных внутривхромосомных инсерций в структуру хромосомной патологии значителен, поскольку теоретический риск формирования гамет с рекомбинантными хромосомами и риск рождения ребенка с хромосомным дисбалансом в семье носителя могут достигать 50%, что имеет ключевое значение для медико-генетического консультирования [4, 5].

На этом фоне особый интерес представляет хромосома 22, отличающаяся высокой концентрацией низкокопийных повторов (LCR), что предрасполагает к формированию широкого спектра сбалансированных и несбалансированных ХП в результате неаллельной гомологичной рекомбинации (NAHR) [6]. Наиболее изучены синдромы реципрокных делеции и дупликации 22q11.2, известные также как сестринские геномные болезни [7, 8]. Но важно отметить, что особую ценность демонстрируют нерекуррентные CNV на хромосоме 22, так как такие случаи раскрывают сложные и разнообразные механизмы структурной организации генома, включая репликационно-

опосредованные и многоступенчатые геномные события, и могут быть представлены множественными участками хромосомного дисбаланса [9, 10]. Такие наблюдения не только расширяют представления о структурной вариативности хромосомы 22, но и имеют практическое значение для медико-генетического консультирования, особенно при выборе тактики пренатальной и преимплантационной диагностики в семьях с больным ребенком [11].

В настоящей работе мы представляем уникальный случай рекомбинантной хромосомы 22 у пациента с аномальным фенотипом. Цель исследования — молекулярно-цитогенетическая характеристика редкой rec(22) с тремя интерстициальными дупликациями вследствие мейотического кроссинговера в гаметогенезе матери-носительницы сложной интрахромосомной перестройки.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Клинические данные

Пациентка — девочка 7 месяцев, направлена на обследование в медико-генетический научный центр им. Н. П. Бочкова в связи с задержкой психомоторного развития и особенностями фенотипа (черепно-лицевые дизморфии). В семье есть старший ребенок — девочка 5 лет — без видимых клинических проявлений, здорова (со слов родителей). Родители здоровы, брак некровнородственный, в гинекологическом анамнезе — две замершие беременности (рис. 2А).

Роды на 36-й неделе беременности. Оценка по шкале Апгар — 7/7 баллов. Масса тела при рождении составляла 2260 г, длина тела — 45 см, окружность головы — 32 см. После рождения ребенок был переведен в отделение патологии новорожденных с диагнозом церебральная ишемия 1–2-й степени, синдром двигательных нарушений. С рождения отмечались задержка моторного развития, двусторонняя тугоухость. На момент первого осмотра (в возрасте 7 месяцев) были отмечены следующие фенотипические особенности: глазной гипертелоризм, обратный эпикант, укороченные глазные щели, закругленный кончик носа, трапецевидная верхняя губа, удлинённый фильтр, высокое небо, длинные пальцы рук. Рост/вес: 68 см (50–75 перцентиль)/6000 г (<3 перцентиль). Моторное развитие с грубой задержкой: ребенок удерживал голову только в положении лежа на животе, не переворачивался. Повторный осмотр был проведен в 2 года, у пациентки сохранилась выраженная задержка моторного развития: села в 1,5 года, стоит

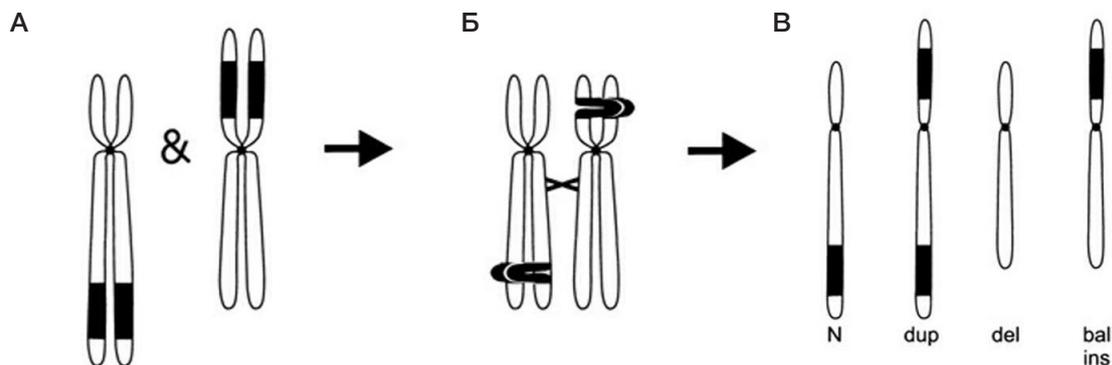


Рис. 1. Формирование гамет после рекомбинации между участками ХП при внутривхромосомной межплечевой инсерции. А. Слева нормальная хромосома, а справа хромосома с инсерцией. Б. Кроссинговер. В. Виды гамет (Адаптировано из: Gardner R. J., Amor D. J., 2018.)

Таблица. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров

Название	Последовательности ДНК-праймеров, 5'-3'	Длина ПЦР-продукта (п.н.)	Геномные координаты (hg19)
dup22q12.3_1	F: GTGGGGTGGAAATAGAGGAGGAAAAGTG	9118	chr22:36,911,962–36,938,387
	R: ACACAATAACGCAGAGAGTGAATGGGT		
dup22q12.3_2	F: ACCCATTTCACTCTCTGCGTTATTGTGT	9818	
	R: CCAGCTTCATCTCATTCCTCTCTTGTC		
dup22q12.3_3	F: CACTCTTGCTGCTCTAGGGTTTCTTCTC	9964	
	R: ATGGGAATCTATTTTGTCTCCTGTGCGCC		
22q13_1	F: GTCTCCCCCTCAAAAATGCTGGTGATAA	9874	
	R: CAAGTAGCCTTCAGAGTTCATCTGCTC		
22q13_2	F: AAGACAGACGGATGGAACCTAGTTGC	9002	
	R: GACATACTTGAGACACTGGAGCTTGACC		
22q13_3	F: AACTCTCTATAATGCCTCCAGGGTCTC	9520	
	R: GCAACACACAAGTTCAGCAAAAACCAAC		
22q-invG-1	F: GTTCAAAGCCCCACAGTCTTCCCAATG	9890	
	R: AGGAGGAGGTCACAAGTCCCATACCACT		
22q-invG-2	F: AGTGGTATGGACTTGTGACCTCCTCCT	9643	
	R: ACATGCTGGCGGGGAAAGAGACAGTTTA		
22q-invG-3	F: GAGTAGGGAGGGATGCTGCTGGGTTAAG	9182	
	R: GAGGAGACCAGAGAAGAGGGTGGCAATG		
22q-invR-1	F: GTGGAGAGGAGAGTGTGAATAGGGAAGT	9068	
	R: GGTGTTGCGAGATGAATGAAGCCAAT		
22q-invR-2	F: CACCCACATTCCTGAAGATGACACTAC	9095	
	R: TGAGTGAGTGATCGCCTCCTTATGAGA		
22q-invR-3	F: AAACCTTACCTCCAAAACCTATCCCA	9259	
	R: TCCCACATCTCTCCATCCTCTTCTGT		

и переступает у опоры с 2 лет. Навыки самообслуживания не сформированы, речевое развитие с легкой задержкой — говорит несколько простых слов.

Молекулярно-цитогенетические исследования

Для детекции CNV был проведен хромосомный микроматричный анализ образца ДНК периферической крови пациента, выполненный с использованием олигонуклеотидных микроматриц CytoScan HD Array (Affymetrix, Santa Clara, США) в соответствии с протоколами производителя. Анализ вариаций числа копий геномных участков проводили с помощью программного обеспечения Chromosome Analysis Suite (ChAS), версия 4.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.; США), а результаты интерпретировали в соответствии с Международной системой цитогеномной номенклатуры (ISCN, 2020). Выявленные CNV сопоставляли с данными, опубликованными в научной литературе, а также с информацией из общедоступных баз данных: Database of Genomic Variants (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) и OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>). Геномные координаты представлены в соответствии со сборкой Human Genome February 2009 (GRCh37/hg19). Оценку клинической значимости вариантов проводили в соответствии со стандартами American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [12].

FISH с коммерческими ДНК-зондами проводили на хромосомных препаратах из культивированных лимфоцитов периферической крови с локус-специфичным (22q11.2 LSI *TBX1*/ 22q13 *SHANK3*) и субтеломерным (Subtelomere 22qter) ДНК-зондами (Kreatech, Нидерланды), а также с ДНК-зондом, специфичным для коротких плеч

acroцентрических хромосом (Acro-p) (MetaSystems, Германия) по соответствующим протоколам фирм-производителей. Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридной системы ThermoBrite (StatSpin, США), анализ — с помощью элифлуоресцентного микроскопа «Axiolmager M.1» (Carl Zeiss, Германия) и компьютерной программы обработки цифровых изображений «Isis» (MetaSystems, Германия).

Важным этапом исследования была разработка несерийных ДНК-зондов с целью уточнения структуры рекомбинантной хромосомы 22 у пациента и обследования родителей. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и базы данных UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>). Для проверки специфичности выбранных праймеров использовали программу OligoAnalyzer™ Tool (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/>). Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Нуклеотидные последовательности подобранных ДНК-праймеров представлены в таблице.

С помощью последовательностей подобранных ДНК-праймеров проводили LR-ПЦР с использованием набора BioMaster LR HS-PCR (2x) («БиолабМикс», Россия) на амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя. Полученные ампликоны очищали на колонках с использованием набора diaGene для очистки ДНК из реакционных смесей (Диаэм, Россия) согласно инструкции производителя, с последующим объединением в одну пробирку очищенных продуктов ПЦР для получения ДНК-зонда размером 30 т.п.н. С целью введения флуоресцентной метки в ДНК-зонд использовали метод nick-трансляции. Для проведения FISH с несерийными

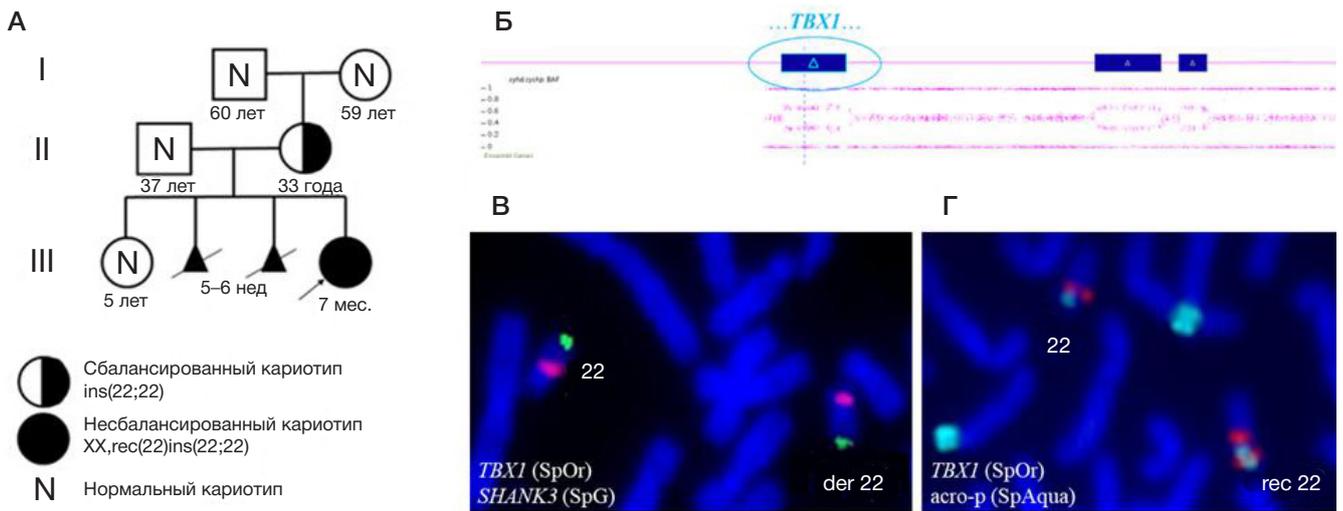


Рис. 2. Семейный случай внутрихромосомной *ins(22;22)*. **А.** Родословная трех поколений семьи с *de novo* гетерозиготным носительством интрахромосомной инсерции 22. **Б.** Профиль гибридизации хромосомы 22, детектированный при XMA, демонстрирует три дупликации на хромосоме 22 у пациентки. **В.** Результат FISH-анализа матери на хромосомную область 22q11.2 (*TBX1* — SpOrange) с контрольным ДНК-зондом на ген *SHANK3* (SpGreen), не вовлеченный в хромосомную перестройку. **Г.** Результат FISH-анализа пациентки на хромосомную область 22q11.2: рекомбинантная хромосома 22 представлена инсерцией дуплицированного фрагмента с вовлеченным геном *TBX1* (SpOrange) в район ядрышкового организатора (p12) (*acro-p* — SpAqua)

ДНК-зондами использовали раздельную денатурацию ДНК на хромосомном препарате и ДНК-зонда [13–15].

Для контрокрасивания хромосом использовали DAPI I (Abbott Molecular, США) в растворе Vectashield (Vector Labs, США) в соотношении 1:20. Для анализа изображений метафазных хромосом применяли программу обработки цифровых изображений Isis (MetaSystems, Германия), установленную в комплексе с эпифлуоресцентным микроскопом Axiomager M.1 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе молекулярно-цитогенетического обследования пациентки с задержкой моторного и психоречевого развития, черепно-лицевыми дизморфиями и тугоухостью провели XMA, при котором выявили три интерстициальные микродупликации, локализованные на длинном плече хромосомы 22: *arr[hg19]22q11.21(18037572_21915207)x3,22q12.3q13.1(36793141_40756125)x3,22q13.2(41818449_43449759)x3* (рис. 2Б) размером 3,9 млн.п.н, 4 млн.п.н. и 1,6 млн.п.н. соответственно.

С целью верификации полученных данных проводили FISH-анализ хромосомных препаратов пациентки, родной сестры и их родителей с коммерческим ДНК-зондом на хромосомный локус 22q11.21 (ген *TBX1*). Установлено, что мать пациентки является носительницей внутрихромосомной межплечевой инсерции участка 22q11.2 в район ядрышкового организатора (p12) (рис. 2В). Таким образом, дупликация, включающая ген *TBX1*, является следствием материнского мейотического кроссинговера в центромерном сегменте хромосом 22, что привело к формированию такой рекомбинантной хромосомы 22 у пациентки (рис. 2Г). При обследовании бабушки и дедушки по материнской линии инсерцию не выявили, что позволяет заключить, что хромосомная перестройка у матери была сформирована *de novo*.

Для верификации второй и третьей микродупликации была выдвинута гипотеза о существовании «единой» дупликации в регионе 22q12.3q13.2. Для этой задачи были разработаны несерийные локус-специфичные ДНК-зонды на два участка хромосомы 22: (hg19): 36,911,962–36,938,387 и (hg19):41,525,966–41,555,314. Дизайн праймеров

представлен в таблице. Проведенный FISH-анализ показал наличие у матери и внутрихромосомной инсерции области q12.3q13.1 в район ядрышкового организатора (p12) хромосомы 22 (рис. 3Б). Таким образом, рекомбинантная хромосома 2 у пациентки содержит не только дупликацию, включающую ген *TBX1* (22q11.2), но и дупликацию q12.3q13.1 материнского происхождения (рис. 3В).

На основании полученных данных была выдвинута гипотеза о сложном механизме формирования хромосомной перестройки у матери пациентки. Между первой (22q11.21) и второй (22q12.3) дупликациями у пробанда была выявлена протяженная область дисомии размером 14,9 млн.п.н. (рис. 3А). Это позволило предположить, что у матери в длинном плече хромосомы 22 районы q11.21 и q12.3q13.1 могли оказаться рядом вследствие парацентрической инверсии (chr22(hg19):18,037,572–36,793,141). Поэтому обе эти области вместе были инсертированы в район ядрышкового организатора (p12) хромосомы 22 как следствие первоначальной *de novo* перестройки в мейозе одного из ее родителей, кариотипы которых были исследованы и оказались нормальными. Для верификации этой гипотезы были дополнительно разработаны еще два несерийных локус-специфичных ДНК-зонда на регионы q11.23 и q12.3 хромосомы 22 (chr22(hg19):24,426,053–24,452,928 и chr22(hg19):34,120,020–34,162,291 (таблица). Схема сложной хромосомной перестройки представлена на рис. 4.

В результате комплексного молекулярно-цитогенетического анализа с использованием как коммерческих, так и несерийных ДНК-зондов гипотеза сложного механизма формирования хромосомной перестройки у матери была подтверждена. Показано, что у пациентки рекомбинантная хромосома 22 с двумя микродупликациями явилась следствием двух последовательных событий в материнском мейозе: инициирующей парацентрической инверсией 22q11.21q12.3 и последующей межплечевой инсерцией районов 22q11.21 и 22q12.3q13.1 в область ядрышкового организатора 22p12. В рамках настоящей работы исследование третьей дупликации не проводилось, изучение планируется продолжить с целью объяснения полного механизма формирования сложной ХП у матери пациентки.

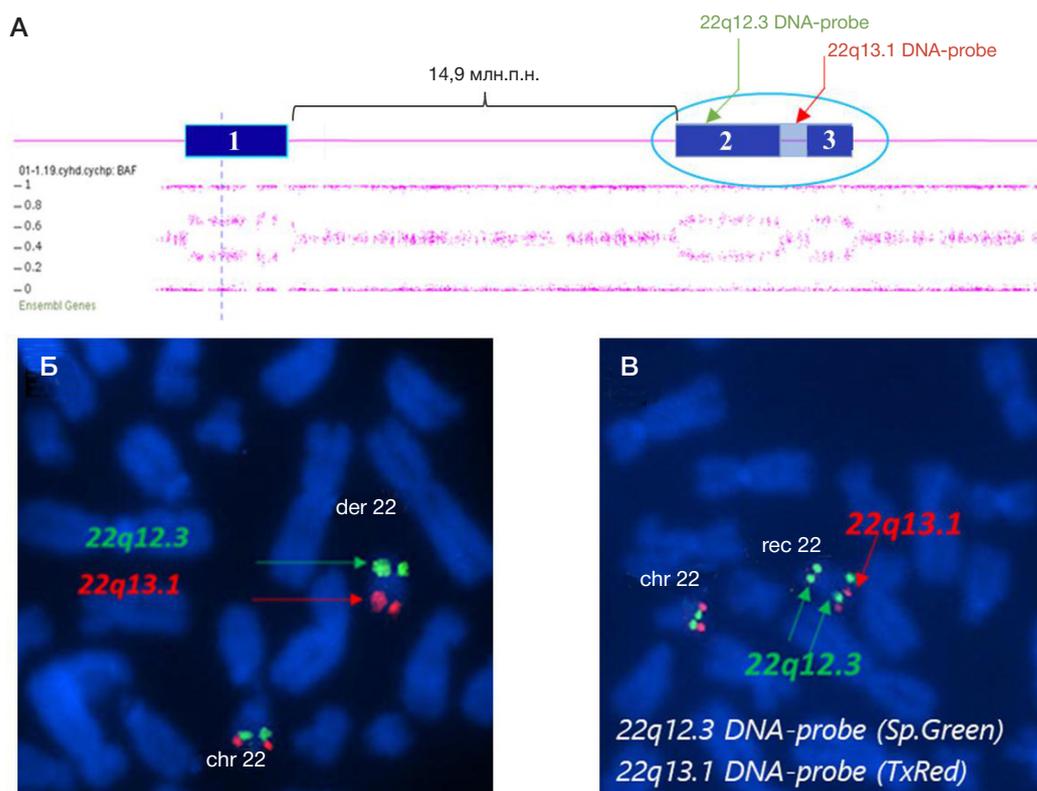


Рис. 3. Результат FISH с несерийными ДНК-зондами, опровергающий гипотезу о «единой» дупликации. **А.** Профиль гибридизации хромосомы 22, детектированный при XMA у пациента и схема геномной локализации несерийных ДНК-зондов, разработанных для гипотезы «единой» дупликации. **Б.** Результат FISH-исследования с несерийными ДНК-зондами на метафазных хромосомах матери: дериватная хромосома 22 представлена инсерцией фрагмента 22q12.3 в район ядрышкового организатора (p12). Хромосомная область 22q13.1 не вовлечена в ХП. **В.** Результат FISH-исследования с несерийными ДНК-зондами на метафазных хромосомах пациентки: рекомбинантная хромосома 22 представлена инсерцией дуплицированного фрагмента 22q12.3 в район ядрышкового организатора (p12). Хромосомная область 22q13.1 не вовлечена в дупликацию и представлена одной копией на каждом гомологе

Таким образом, сочетание XMA и FISH с коммерческими и несерийными ДНК-зондами позволило визуализировать механизм формирования хромосомного дисбаланса. Согласно родословной семьи, включающей три поколения, эмпирический риск повторного рождения ребенка с хромосомным/геномным дисбалансом или спонтанного прерывания беременности оценивается в 75%, что является высоким генетическим риском (рис. 2А).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Представленный случай демонстрирует редкий пример формирования рекомбинантной хромосомы 22 вследствие мейотической сегрегации сложной материнской внутривхромосомной перестройки — сочетания инверсии и инсерции. Похожие механизмы ранее описывались в исследованиях *rec(22)*, возникающих вследствие материнских внутривхромосомных перестроек. Так, описаны случаи *rec(22)*, при которых материнские внутривхромосомные инверсии приводили к дупликации дистальных участков 22q у потомства [16, 17]. Есть сообщение о пациентке с дупликацией 22q13.1q13.2, размером 7 млн.п.н., которая оказалась продуктом материнской инсерции [18]. Наш случай дополняет эти наблюдения, демонстрируя возможность образования рекомбинантной хромосомы 22 с несколькими CNV в результате наследования материнской комплексной внутривхромосомной межглицевой инсерции в сочетании с инверсией.

Акроцентрическая хромосома 22 является одной из самых коротких хромосом человека и при этом имеет самую высокую плотность LCR в ее длинном плече.

LCR представляют собой блоки ДНК размером 10–400 т.п.н., имеющие высокую степень (95–97%) идентичности нуклеотидных последовательностей, вследствие чего в этих районах происходит неаллельная гомологичная рекомбинация (НАГР), лежащая в основе типичных делеций и дупликаций 22q11.2 [6, 19]. Оптическое геномное картирование подтвердило значительную вариабельность LCR22 в популяции, что повышает вероятность нерекуррентных и сложных хромосомных перестроек [20]. В то же время для объяснения сложных многоэтапных событий, подобных описанному нами, полагают, что имеют место и другие, репликационно-опосредованные механизмы их формирования, а именно остановка вилки репликации и переключение микроматрицы (Fork Stalling and Template Switching -FoSTeS) или репликация, индуцированная микрогомлогией в точках разрыва (Microhomology-Mediated Break-Induced Replication (MMBIR) [3, 9, 10, 21].

В нашем случае у матери выявлена сложная внутривхромосомная перестройка: сочетание инициирующей парацентрической инверсии 22q11.21q12.3 (с координатами *chr22(hg19):18,037,572–36,793,141*) и последующей межглицевой инсерции районов 22q11.21 и 22q12.3q13.1 в область ядрышкового организатора 22p12. Проксимальная точка разрыва инверсии локализуется в зоне LCR22 A–B (~18–21 млн.п.н.), являющейся одной из «горячих точек» геномной нестабильности, приводящей к хромосомным перестройкам, опосредованным НАГР. Инверсии, охватывающие блоки низкокопийных повторов LCR22A–B или LCR22B–D/C, по данным литературы способны инициировать нерекуррентные хромосомные перестройки [6, 22]. Дистальная точка разрыва инверсии

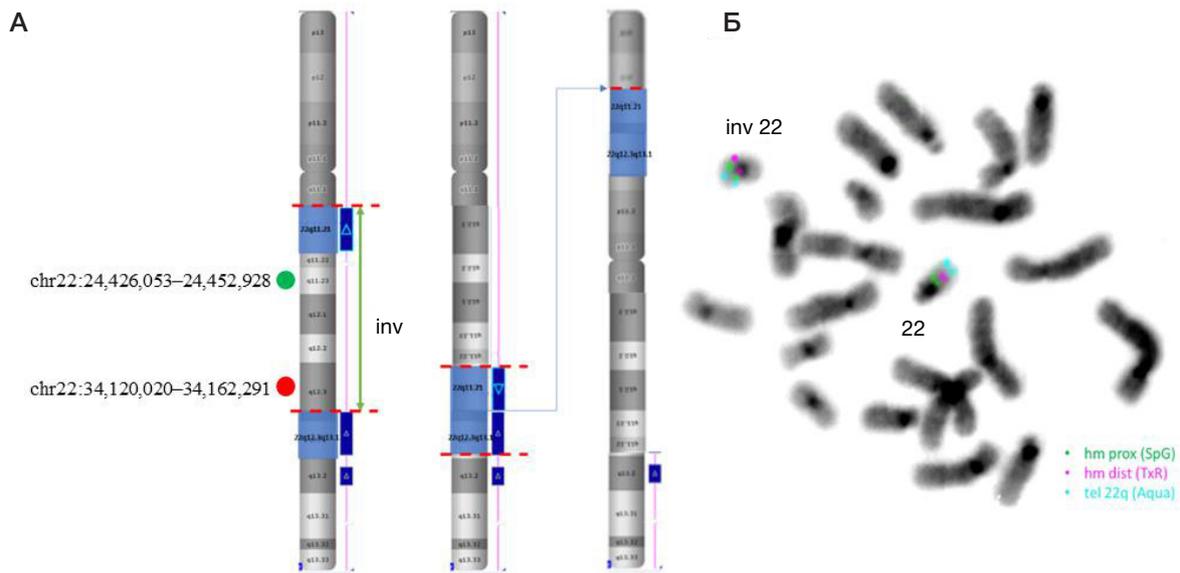


Рис. 4. А. Схема механизма формирования *de novo* материнской сложной ХП. **Б.** Результат FISH-анализа с дистальным несерийным ДНК-зондом (TxRed), проксимальным ДНК-зондом (SpGreen) на область инверсии (chr22(hg19):18,037,572–36,793,141) и коммерческим ДНК-зондом на субтеломерный район длинного плеча хромосомы 22 (SpAqua)

в длинном плече хромосомы 22 (~36,8 млн.п.н.) выходит за пределы классических LCR22 и расположена в области уникальных последовательностей 22q12.3, что делает вероятным участие репликационно-опосредованных механизмов (FoSTeS/MMBIR) [21–23]. Инсерция протяженного хромосомного участка 22q в короткое плечо хромосомы 22 (22p) тоже объяснима. Известно, что *p*-плечи акроцентрических хромосом, содержащие район ядрышкового организатора (ЯОР) и многочисленные блоки повторов — динамичные регионы генома [24]. Таким образом, сочетание инверсии с участием LCR22 и инсерции в ЯОР-область 22p формирует уникальный структурный фон, способный приводить к множественным дупликациям при мейотической сегрегации.

Наш случай расширяет спектр ранее описанных *rec(22)* и демонстрирует, что при сложной материнской ХП возможно формирование нескольких интерстициальных дупликаций у потомства. Этот механизм объединяет два ключевых момента — переменную архитектуру генома вследствие обогащенности хромосомы 22 блоками низкокопийных повторов ДНК с одной стороны, и динамичность рибосомных повторов района ядрышкового организатора ее короткого плеча, с другой стороны.

Клинические проявления у нашего пациента с множественными CNV на хромосоме 22 включают задержку моторного и психоречевого развития, краниофациальные дизморфии, гипотонию и тугоухость, соответствующие фенотипическому спектру 22q11.2 дупликационного синдрома, для которого характерны задержка развития, поведенческие расстройства, нарушения слуха, черепно-лицевые аномалии и переменная степень когнитивных нарушений. Аномалии фенотипа при дупликации 22q11.2 отличаются выраженной гетерогенностью, что связывают как с дозозависимыми эффектами ключевых генов, включая *TBX1*, так и с влиянием дополнительных дуплицированных сегментов 22q12–q13, которые могут вносить вклад в нейроразвитие и слуховую функцию [8, 25, 26].

С точки зрения методологии, представленный случай подчеркивает необходимость комплексного цитогеномного анализа. Стандартное кариотипирование не позволяет выявлять CNV размером менее 10 млн.п.н., поэтому

в данном исследовании ключевую роль сыграли XMA и FISH. XMA продемонстрировал наличие трех интерстициальных микродупликаций, однако не дал ответа на вопрос об их механизме формирования. Только применение FISH с использованием как коммерческих, так и разработанных несерийных ДНК-зондов позволило определить топологию хромосомной перестройки и показать, что две из трех дупликаций возникли вследствие патологической мейотической сегрегации материнской сложной внутривхромосомной ХП. Важно подчеркнуть, что применение несерийных локус-специфичных ДНК-зондов, полученных методом ПЦР длинных фрагментов, оказалось принципиально значимым: они позволили дифференцировать гипотезу о «единой» дупликации от наличия двух отдельных дупликаций и подтвердить парацентрическую инверсию в длинном плече хромосомы 22 как ключевой, стартовый момент в формировании комплексной хромосомной перестройки у матери.

Таким образом, цитогеномный подход при использовании как коммерческих, так и разработанных собственных несерийных ДНК-зондов, позволил определить происхождение, механизм формирования и реконструировать сложную внутривхромосомную перестройку у пациентки с задержкой моторного и психоречевого развития и признаками дисэмбриогенеза. Полученные данные позволили также установить высокий повторный риск рождения ребенка с хромосомной патологией в данной семье.

ВЫВОДЫ

Настоящее исследование представляет собой молекулярно-цитогенетическую характеристику редкого случая формирования множественных интерстициальных дупликаций хромосомы 22 в результате мейотической сегрегации сложной внутривхромосомной инверсии, возникшей *de novo* у матери пробанда. Показано, что сочетание парацентрической инверсии и последовательных инсерционных событий может приводить к формированию рекомбинантных хромосом с несколькими CNV, определяющими клинически значимый хромосомный дисбаланс.

Литература

- Liehr T, Weise A, Mrasek K, Ziegler M, Padutsch N, Wilhelm K, et al. Recombinant chromosomes resulting from parental pericentric inversions — two new cases and a review of the literature. *Front Genet.* 2019; 10: 1165. DOI: 10.3389/fgene.2019.01165.
- Madan K, Menko FH. Intrachromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet.* 1992; 89 (1): 1–9. DOI: 10.1007/BF00207032.
- Carvalho CM, Lupski JR. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat Rev Genet.* 2016; 17 (4): 224–38. DOI: 10.1038/nrg.2015.25.
- Gardner RJ, Amor DJ. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2018; 440 p.
- Nowakowska BA, de Leeuw N, Ruivenkamp CA, Sikkema-Raddatz B, Crolla JA, Thoelen R, et al. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet.* 2012; 20 (2): 166–70. DOI: 10.1038/ejhg.2011.157.
- Vervoort L, Vermeesch JR. The 22q11.2 low copy repeats. *Genes (Basel).* 2022; 13 (11): 2101. DOI: 10.3390/genes13112101.
- Demaerel W, Hosseinzadeh M, Nouri N, Sedghi M, Dimitriadou E, Salehi M, et al. Reciprocal 22q11.2 deletion and duplication in siblings with karyotypically normal parents. *Cytogenet Genome Res.* 2016; 148 (1): 1–5. DOI: 10.1159/000445089.
- Portnoi MF. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet.* 2009; 52 (2–3): 88–93. DOI: 10.1016/j.ejmg.2009.02.008.
- Arlt MF, Wilson TE, Glover TW. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22 (3): 204–10. DOI: 10.1016/j.gde.2012.01.009.
- Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22 (3): 211–20. DOI: 10.1016/j.gde.2012.02.012.
- Li S, Han X, Ye M, Chen S, Shen Y, Niu J, et al. Prenatal diagnosis of microdeletions or microduplications in the proximal, central, and distal regions of chromosome 22q11.2: ultrasound findings and pregnancy outcome. *Front Genet.* 2019; 10: 813. DOI: 10.3389/fgene.2019.00813.
- Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of ACMG and ClinGen. *Genet Med.* 2020; 22 (2): 245–57. DOI: 10.1038/s41436-019-0686-8.
- Minzhenkova ME, Yurchenko DA, Semenova NA, Markova ZG, Tarlycheva AA, Shilova NV. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genet Mol Res.* 2022; 21 (4). DOI: 10.4238/gmr19065.
- Юрченко Д. А., Миньженкова М. Е., Твеленева А. А., Воронцова Е. О., Харченко Т. В., Шилова Н. В. Цитогеномный подход в диагностике инвертированных дупликаций со смежными терминальными делециями. *Медицинская генетика.* 2023; 22 (5): 54–62.
- Юрченко Д. А. Молекулярно-цитогенетические характеристики и особенности диагностики вариаций числа копий участков ДНК (CNV) [диссертация]. М., 2022.
- Zonk VS, Jesurun CA, Morgan DL, Lockhart LH, Velagaleti GVN. Molecular cytogenetic characterization of a recombinant chromosome rec(22)dup(22q)inv(22)(p13q12.2). *Am J Med Genet A.* 2004; 124A (1): 92–95. DOI: 10.1002/ajmg.a.20384.
- Boyd LJ, Livingston JS, Brown MG, Lawce HJ, Gilhooly JT, Wildin RS, et al. Meiotic exchange event within the stalk region of an inverted chromosome 22 results in a recombinant chromosome with duplication of the distal long arm. *Am J Med Genet A.* 2005; 138 (4): 355–60. DOI: 10.1002/ajmg.a.30895.
- Pramparo T, de Gregori M, Gimelli S, Ciccone R, Frondizi D, Liehr T, et al. A 7 Mb duplication at 22q13 in a girl with bipolar disorder and hippocampal malformation. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A (13): 1754–60. DOI: 10.1002/ajmg.a.32326.
- Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 2002; 18 (2): 74–82. DOI: 10.1016/s0168-9525(02)02592-1.
- Pastor S, Tran O, Jin A, Carrado D, Silva BA, Uppuluri L, et al. Optical mapping of the 22q11.2DS region reveals complex repeat structures and preferred locations for NAHR. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 12235. DOI: 10.1038/s41598-020-69134-4.
- Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoStEs/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet.* 2009; 41 (7): 849–53. DOI: 10.1038/ng.399.
- Demaerel W, Mostovoy Y, Yilmaz F, Vervoort L, Pastor S, Hestand MS, et al. The 22q11 low copy repeats are characterized by unprecedented size and structural variability. *Genome Res.* 2019; 29 (9): 1389–401. DOI: 10.1101/gr.248682.119.
- Guo T, Diacou A, Nomaru H, McDonald-McGinn DM, Hestand M, Demareel W, et al. Deletion size analysis of 1680 22q11.2DS subjects identifies a new recombination hotspot on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet.* 2018; 27 (7): 1150–63. DOI: 10.1093/hmg/ddy028.
- van Sluis M, van Vuuren C, Mangan H, McStay B. NORs on human acrocentric chromosome p-arms are active by default and can associate with nucleoli independently of rDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117 (19): 10368–77. DOI: 10.1073/pnas.2001812117.
- Purow J, Waidner L, Ale H. Review of the pathophysiology and clinical manifestations of 22q11.2 deletion and duplication syndromes. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2025; 68 (1): 23. DOI: 10.1007/s12016-025-09035-4.
- Deepika M, Tella S, Avvari S, Pratibha N, Ananthapur V. A rare case of dysmorphism with duplication in chromosome 22. *Indian J Clin Biochem.* 2022; 37 (4): 504–6. DOI: 10.1007/s12291-020-00945-y.

References

- Liehr T, Weise A, Mrasek K, Ziegler M, Padutsch N, Wilhelm K, et al. Recombinant chromosomes resulting from parental pericentric inversions — two new cases and a review of the literature. *Front Genet.* 2019; 10: 1165. DOI: 10.3389/fgene.2019.01165.
- Madan K, Menko FH. Intrachromosomal insertions: a case report and a review. *Hum Genet.* 1992; 89 (1): 1–9. DOI: 10.1007/BF00207032.
- Carvalho CM, Lupski JR. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat Rev Genet.* 2016; 17 (4): 224–38. DOI: 10.1038/nrg.2015.25.
- Gardner RJ, Amor DJ. Gardner and Sutherland's Chromosome Abnormalities and Genetic Counselling. 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2018; 440 p.
- Nowakowska BA, de Leeuw N, Ruivenkamp CA, Sikkema-Raddatz B, Crolla JA, Thoelen R, et al. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet.* 2012; 20 (2): 166–70. DOI: 10.1038/ejhg.2011.157.
- Vervoort L, Vermeesch JR. The 22q11.2 low copy repeats. *Genes (Basel).* 2022; 13 (11): 2101. DOI: 10.3390/genes13112101.
- Demaerel W, Hosseinzadeh M, Nouri N, Sedghi M, Dimitriadou E, Salehi M, et al. Reciprocal 22q11.2 deletion and duplication in siblings with karyotypically normal parents. *Cytogenet Genome Res.* 2016; 148 (1): 1–5. DOI: 10.1159/000445089.
- Portnoi MF. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet.* 2009; 52 (2–3): 88–93. DOI: 10.1016/j.ejmg.2009.02.008.
- Arlt MF, Wilson TE, Glover TW. Replication stress and mechanisms of CNV formation. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22 (3): 204–10. DOI: 10.1016/j.gde.2012.01.009.
- Liu P, Carvalho CM, Hastings PJ, Lupski JR. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev.* 2012; 22 (3): 211–20. DOI: 10.1016/j.gde.2012.02.012.
- Li S, Han X, Ye M, Chen S, Shen Y, Niu J, et al. Prenatal diagnosis of microdeletions or microduplications in the proximal, central,

- and distal regions of chromosome 22q11.2: ultrasound findings and pregnancy outcome. *Front Genet.* 2019; 10: 813. DOI: 10.3389/fgene.2019.00813.
12. Riggs ER, Andersen EF, Chery AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of ACMG and ClinGen. *Genet Med.* 2020; 22 (2): 245–57. DOI: 10.1038/s41436-019-0686-8.
 13. Minzhenkova ME, Yurchenko DA, Semenova NA, Markova ZG, Tarlycheva AA, Shilova NV. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genet Mol Res.* 2022; 21 (4). DOI: 10.4238/gmr19065.
 14. Yurchenko DA, Minzhenkova ME, Tveleneva AA, Voroncova EO, Harchenko TV, Shilova NV. Citogenomnyj podhod v diagnostike invertirovannyh duplikacij so smezhnymi terminal'nymi delecijami. *Medicinskaya genetika.* 2023; 22 (5): 54–62. Russian.
 15. Yurchenko DA. Molekulyarno-citogeneticheskie harakteristiki i osobennosti diagnostiki variacij chisla kopij uchastkov DNK (CNV) [dissertaciya]. M., 2022. Russian.
 16. Tonk VS, Jesurun CA, Morgan DL, Lockhart LH, Velagaleti GVN. Molecular cytogenetic characterization of a recombinant chromosome rec(22)dup(22q)inv(22)(p13q12.2). *Am J Med Genet A.* 2004; 124A (1): 92–95. DOI: 10.1002/ajmg.a.20384.
 17. Boyd LJ, Livingston JS, Brown MG, Lawce HJ, Gilhooly JT, Wildin RS, et al. Meiotic exchange event within the stalk region of an inverted chromosome 22 results in a recombinant chromosome with duplication of the distal long arm. *Am J Med Genet A.* 2005; 138 (4): 355–60. DOI: 10.1002/ajmg.a.30895.
 18. Pramparo T, de Gregori M, Gimelli S, Ciccone R, Frondizi D, Liehr T, et al. A 7 Mb duplication at 22q13 in a girl with bipolar disorder and hippocampal malformation. *Am J Med Genet A.* 2008; 146A (13): 1754–60. DOI: 10.1002/ajmg.a.32326.
 19. Stankiewicz P, Lupski JR. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet.* 2002; 18 (2): 74–82. DOI: 10.1016/s0168-9525(02)02592-1.
 20. Pastor S, Tran O, Jin A, Carrado D, Silva BA, Uppuluri L, et al. Optical mapping of the 22q11.2DS region reveals complex repeat structures and preferred locations for NAHR. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 12235. DOI: 10.1038/s41598-020-69134-4.
 21. Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoSteS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet.* 2009; 41 (7): 849–53. DOI: 10.1038/ng.399.
 22. Demaerel W, Mostovoy Y, Yilmaz F, Vervoort L, Pastor S, Hestand MS, et al. The 22q11 low copy repeats are characterized by unprecedented size and structural variability. *Genome Res.* 2019; 29 (9): 1389–401. DOI: 10.1101/gr.248682.119.
 23. Guo T, Diacou A, Nomaru H, McDonald-McGinn DM, Hestand M, Demaerel W, et al. Deletion size analysis of 1680 22q11.2DS subjects identifies a new recombination hotspot on chromosome 22q11.2. *Hum Mol Genet.* 2018; 27 (7): 1150–63. DOI: 10.1093/hmg/ddy028.
 24. van Sluis M, van Vuuren C, Mangan H, McStay B. NORs on human acrocentric chromosome p-arms are active by default and can associate with nucleoli independently of rDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020; 117 (19): 10368–77. DOI: 10.1073/pnas.2001812117.
 25. Purow J, Waidner L, Ale H. Review of the pathophysiology and clinical manifestations of 22q11.2 deletion and duplication syndromes. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2025; 68 (1): 23. DOI: 10.1007/s12016-025-09035-4.
 26. Deepika M, Tella S, Awari S, Pratibha N, Ananthapur V. A rare case of dysmorphism with duplication in chromosome 22. *Indian J Clin Biochem.* 2022; 37 (4): 504–6. DOI: 10.1007/s12291-020-00945-y.

В МЕДИЦИНЕ СЛЕДУЕТ ИЗБЕГАТЬ ТЕРМИНОВ «ДОМИНАНТНЫЙ» И «РЕЦЕССИВНЫЙ» ИЗ-ЗА РАЗВИТИЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

А. М. Гамисония ✉, Д. В. Ребриков

Российский национальный исследовательский медицинский университет (Пироговский Университет), Москва, Россия

Понимание устройства системы ведет к оптимизации описывающей ее модели. Модель движения небесных тел Птолемея многократно усложнялась с целью подгонки под реальность, пока точка зрения исследователей кардинально не изменилась. Аналогично и «фенотипическая генетика» до сих пор пытается описывать наблюдаемое в терминах XIX в.: доминантность, рецессивность, пенетрантность, экспрессивность, комплементарность, эпистаз и т. д. Сегодня мы не просто понимаем устройство Солнечной системы, но видим Вселенную на четырнадцать миллиардов световых лет. Использовать в клинической генетике описательную фенотипическую терминологию — то же самое, что определять расположение небесных тел по гороскопу. В статье рассмотрено соотношение некоторых молекулярных механизмов наследования и их фенотипических проявлений. На фоне возрастающей роли геноредактирующей, генозаместительной и генокомпенсаторной терапии использование фенотипических терминов «доминантный» и «рецессивный» становится нежелательным, поскольку не отражает молекулярный профиль заболевания и может вводить врачей в заблуждение при выборе метода лечения.

Ключевые слова: доминантный, рецессивный, генотип, фенотип, потеря функции, возрастание функции, гаплонедостаточность, доминантно-негативный эффект, клиническая генетика, генозаместительная терапия, генокомпенсаторная терапия, геномное редактирование

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания МЗ РФ Рег № 123021500064-0 «Разработка технологии персонализированных генотерапевтических лекарственных препаратов на платформе AAV и препаратов для лечения синдрома Санфилиппо и множественной эпифизарной дисплазии».

Благодарности: авторы признательны Сергею Глаголеву за критические комментарии.

Вклад авторов: А. М. Гамисония — анализ и обобщение данных литературы, написание текста и оформление рукописи; Д. В. Ребриков — критический пересмотр и редактирование текста рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Алина Мухадиновна Гамисония
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997, Россия; amgamisoniya@mail.ru

Статья получена: 23.10.2025 **Статья принята к печати:** 30.10.2025 **Опубликована онлайн:** 31.10.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.055

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/>).

THE TERMS "DOMINANT" AND "RECESSIVE" SHOULD BE AVOIDED DUE TO GENE THERAPY

Gamisonia AM ✉, Rebrikov DV

Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University), Moscow, Russia

The accumulation of scientific data can conflict with theoretical propositions, requiring their revision. Ptolemy's model of celestial motion was repeatedly "upgraded" until the paradigm fundamentally changed. Today, we not only understand the structure of the solar system but also see the universe across fourteen billion light-years. Similarly, phenotype-based medical genetics still operates with concepts such as dominance, recessiveness, penetrance, expressivity, complementarity, epistasis, and so on. These are descriptive terms of limited accuracy, which are redundant and often confounding in clinical settings. This opinion article re-examines the relationship between molecular inheritance and its phenotypic manifestations in light of the growing role of gene editing and gene therapy. We believe that the use of the classical terms "dominant" and "recessive" in a medical context should be avoided as non-informative and possibly misleading in terms of clinical decisions and treatment choices.

Keywords: dominant, recessive, genotype, phenotype, loss-of-function, gain-of-function, haploinsufficiency, dominant-negative effect, clinical genetics, compensatory gene therapy, genome editing

Funding: This work was supported by the State Assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation, Registration No. 123021500064-0, "Development of technology for personalized gene therapy drugs based on the AAV platform and drugs for the treatment of Sanfilippo syndrome and multiple epiphyseal dysplasia."

Acknowledgements: The authors are grateful to Sergey Glagolev for his critical comments

Author contribution: Gamisoniya AM — analysis and summary of literature data, manuscript writing, manuscript design; Rebrikov DV — critical revision and editing of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alina Mukhadinovna Gamisoniya
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997, Russia; amgamisoniya@mail.ru

Received: 23.10.2025 **Accepted:** 30.10.2025 **Published online:** 31.10.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.055

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/>).

Установление взаимосвязи между генотипом и его реализацией (фенотипом) является ключевой задачей генетики, что для диплоидных организмов осложняется взаимодействием двух полных наборов (различающейся) генетической информации. Проявляющийся в потомстве родительский признак Грегор Мендель называл доминирующим (доминантным), а «исчезающий» — рецессивным. На сегодняшний день мы знаем, что признаки представляют собой реализацию функции белков (или регуляторных РНК), закодированных в ДНК, а доминантный фенотип может быть следствием как повышенной, так и пониженной активности/концентрации белка за счет различных генетических и эпигенетических факторов: аллельного полиморфизма белок-кодирующей последовательности, профиля метилирования ДНК, модификации гистонов и активности промотора, малых регуляторных РНК, посттрансляционной модификации белка, полигенных взаимодействий и т. п.

В медицинской генетике мутации, приводящие к снижению или потере функции (loss-of-function, LOF), как правило, ассоциируют с рецессивным наследованием, а приводящие к «избытку функции» (gain-of-function, GOF) — с доминантным. Однако существует множество исключений из этого упрощенного правила, что указывает на важность понимания функционального контекста и биологической роли затрагиваемого белка или соответствующего регуляторного механизма, особенно в контексте назначения врачами современных генотерапевтических препаратов.

Бурное развитие технологий управления генетической программой (включая изменение активности генов за счет доставки дополнительных копий, CRISPR-редактирования или воздействия малых РНК) привело к появлению широкого спектра высокотехнологичных лекарственных препаратов, назначаемых с целью компенсации генетического нарушения (если функции не хватает — очевидно, что ее необходимо усилить, если же она избыточна — ослабить). При этом в описании заболевания, клинических рекомендациях по лечению заболевания, заключениях по результатам лабораторных исследований и даже в инструкциях к генопрепарату продолжают встречаться фенотипические термины середины XIX в. До 8% лабораторных заключений по исследованию молекулярных причин моногенного наследственного заболевания неправильно интерпретируются врачом-генетиком из-за путаницы с фенотипическими терминами (на основании собственного анализа литературы).

Терминологическая база: типы наследования и молекулярные механизмы

Для диплоидных организмов (включая X-хромосому для женского пола) в контексте наследственных заболеваний аутосомно-доминантное (АД) и аутосомно-рецессивное (АР) наследование — два основных варианта проявления мутаций в родословной. При АД-наследовании для развития заболевания достаточно одной мутантной копии гена (гетерозиготное состояние), что характеризуется 50% риском вертикальной передачи болезни из поколения в поколение (примеры — болезнь Хантингтона, болезнь Томсена, болезнь Крейтцфельда-Якоба и еще более 4000 заболеваний) [1–3].

При АР-наследовании для развития заболевания необходима поломка обеих копий гена (гомозиготное/компаунд-гетерозиготное состояние). Родители при этом обычно являются здоровыми носителями, а заболевание у

потомства возникает за счет совпадения нефункциональных аллелей с вероятностью 25% (примеры — наследственная тугоухость, муковисцидоз, фенилкетонурия и еще более 3000 заболеваний) [4–6].

В случае X-сцепленного рецессивного наследования у лиц мужского пола заболевание или признак фенотипически проявляется в гемизиготном состоянии, в то время как для проявления заболевания у лиц женского пола необходима гомозиготность/компаунд-гетерозиготность по мутации. Классическими примерами данной группы заболеваний являются гемофилия А и дальтонизм, а всего известно более 100 подобных заболеваний [7, 8].

При X-сцепленном доминантном наследовании для проявления патологии достаточно наличия единственного мутантного аллеля. Данный тип наследования характеризуется более тяжелыми последствиями для лиц мужского пола, у которых мутация часто оказывается летальной на ранних стадиях развития. Большая женщина с вероятностью 50% передает заболевание потомству обоего пола, в то время как больной мужчина передает мутантный аллель всем своим дочерям и ни одному из сыновей. Ярким примером заболевания с таким механизмом наследования служит синдром Ретта (в большинстве случаев, однако, возникающий *de novo*) и еще около 40 заболеваний [9]. При этом необходимо учитывать, что у женщин в результате случайной инактивации одной из X-хромосом патогенный аллель в каждой конкретной клетке будет либо активен, либо инактивирован. Соотношение этих клеток может варьировать, что объясняет феномен различной выраженности симптомов у гетерозиготных носительниц (мозаицизм).

В классическом менделевском наследовании предполагается 100% фенотипическое проявление любого аллеля (пенетрантность) с одинаковой силой (экспрессивность), а наличие мутантного варианта (при соответствующем числе копий) однозначно приводит к развитию ожидаемого фенотипа. На практике же для многих наследственных заболеваний, как аутосомно-доминантных, так и X-сцепленных, наблюдается так называемая неполная пенетрантность (когда у части носителей патогенного аллеля заболевание клинически не проявляется на протяжении всей жизни из-за геномного окружения и факторов внешней среды). Неполная пенетрантность создает значительные трудности для медико-генетического консультирования, так как фенотипически здоровый индивид может передать мутантный аллель потомкам, у которых внезапно проявится заболевание. Чтобы окончательно запутать студентов, дополнительно выделяют возраст-зависимую пенетрантность и переменную экспрессивность (хотя очевидно, что проявление любого признака возраст-зависимо и вариативно по силе, даже у монозиготных близнецов). Например, для аутосомно-доминантного нейрофиброматоза 1-го типа или наследственных онкологических синдромов, вызываемых мутациями в генах-супрессорах опухолей (таких как BRCA1 или TP53), пенетрантность считают возраст-зависимой, а экспрессивность — переменной [10].

Условность доминантности и рецессивности в контексте GOF- и LOF-мутаций

С молекулярной точки зрения разные типы наследования, как правило, связаны с разными типами мутаций. Мутации типа GOF наделяют белок новой или усиленной (до уровня

токсичной) функцией, что патогенно даже при нормальном втором аллеле. Такой механизм, чаще всего, лежит в основе доминантных заболеваний. При этом заболевание, как правило, встречается только у гетерозигот, поскольку гомозиготность по столь критичным нарушениям приводит к гибели эмбриона на ранних стадиях развития.

Мутации типа LOF приводят к полной или частичной утрате функции белка (например, вследствие выключения промотора или грубого нарушения структуры белка) и обычно ассоциированы с рецессивными заболеваниями [11, 12].

Однако при определенных условиях LOF-мутации могут приводить к доминантным (для гетерозигот) патологиям. Это происходит через два основных механизма: гаплонедостаточность и доминантно-негативный эффект.

Гаплонедостаточность возникает, когда уровня нормального белка, синтезируемого с единственного функционирующего аллеля, недостаточно для реализации необходимых функций в полном объеме, что приводит к развитию заболевания (примеры — синдром Марфана, синдром Ди Джорджи, синдром Уильямса и еще около 500 заболеваний) [13–15], а на фоне неполной пенетрантности гаплонедостаточность может давать предрасположенность к заболеванию (примеры — гены-супрессоры опухолей, например, p53 при синдроме Ли-Фраумени, BRCA1 при раке яичников и др.) [16, 17].

Доминантно-негативный эффект наблюдается, когда LOF-мутантный белок не просто теряет функцию, но и активно нарушает работу внутриклеточных систем, например, за счет включения в мультимерные комплексы, изменения титра рецептора и иных способов конкурентного ингибирования. Таким образом, LOF-мутация может проявляться как по рецессивному, так и по доминантному типу (примеры — синдром Бругада, синдром Каллера–Джонса и еще около 700 заболеваний) [18, 19].

Таким образом, сравнивая гетерозиготный GOF-эффект гиперактивности/сверхконцентрации белка и гетерозиготный же доминантно-негативный LOF-эффект конкурентного ингибирования мультикомплексов, можно утверждать, что ключевым фактором для понимания молекулярных механизмов патологии и выбора корректной патогенетической терапии (доставки гена или геномного редактирования) является именно нехватка или избыток функции, а не гомо/гетерозиготность (и тем более не фенотип).

Неполная пенетрантность добавляет неопределенности в принятие решения о применении генопрепарата, особенно при назначении лечения до клинического проявления моногенного наследственного заболевания [20]. В таких случаях необходимо взвешивать обратимость патологических процессов с отсроченным фенотипическим проявлением и безопасность генопрепарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной медицинской генетике фенотипические термины «доминантный» и «рецессивный» утрачивают свою диагностическую и прогностическую ценность. Их использование может вводить в заблуждение клиницистов при интерпретации результатов генетического тестирования и, что критически важно, при выборе терапевтической стратегии. В условиях бурного развития методов генозаместительной, генокомпенсаторной терапии и геномного редактирования акцент должен смещаться с классификации типа наследования на точное определение молекулярного патогенеза — является ли причина заболевания следствием недостатка или избытка конкретной макромолекулы (белка, тРНК и др.). Такой функциональный подход является необходимым условием для назначения патогенетически обоснованной и персонализированной терапии.

Литература

- McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European journal of neurology*, 25 (1): 24–34. Available from: <https://doi.org/10.1111/ene.13413>.
- Suetterlin K, Matthews E, Sud R, McCall S, Fialho D, Burge J, et al. Translating genetic and functional data into clinical practice: a series of 223 families with myotonia. *Brain: a journal of neurology*. 2022; 145 (2): 607–20. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awab344>.
- Chen C, Dong XP. Epidemiological characteristics of human prion diseases. *Infectious diseases of poverty*. 2016; 5 (1): 47. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0143-8>.
- Sommen M, Schrauwen I, Vandeweyer G, Boeckx N, Comeveaux JJ, van den Ende J, et al. DNA Diagnostics of Hereditary Hearing Loss: A Targeted Resequencing Approach Combined with a Mutation Classification System. *Human mutation*. 2016; 37 (8): 812–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/humu.22999>.
- Polgreen PM, Comellas AP. Clinical Phenotypes of Cystic Fibrosis Carriers. *Annual review of medicine*. 2022; 73: 563–74. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042120-020148>.
- van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, Burlina A, Longo N, Bosch AM. Phenylketonuria. *Nature reviews. Disease primers*. 2021; 7 (1): 36. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00267-0>.
- Bertorp E, Fischer K, Hart DP, Mancuso ME, Stephensen D, Shapiro AD, et al. Haemophilia. *Nature reviews. Disease primers*. 2021; 7 (1): 45. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00278-x>.
- Iarossi G, Coppè AM, Passarelli C, Maltese PE, Sinibaldi L, Cappelli A, et al. Blue Cone Monochromatism with Foveal Hypoplasia Caused by the Concomitant Effect of Variants in OPN1LW/OPN1MW and GPR143 Genes. *International journal of molecular sciences*. 2021; 22 (16): 8617. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22168617>.
- Renieri A, Meloni I, Longo I, Ariani F, Mari F, Pescucci C, Cambi F. Rett syndrome: the complex nature of a monogenic disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2003; 81 (6): 346–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0444-9>.
- Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; 25 (11): 1329–33. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.1066>.
- Jiao SY, Yang YH, Chen SR. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Human reproduction update*. 2021; 27 (1): 154–89. Available from: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa034>.
- Mailik I, Kelley CP, Wang ET, Todd PK. Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2021; 22 (9): 589–607. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00382-6>.
- Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2004; 114 (2): 172–81. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI20641>.
- Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*. 2001; 410 (6824): 97–101. Available from: <https://doi.org/10.1038/35065105>.

15. Metcalfe K, Simeonov E, Beckett W, Donnai D, Tassabehji M. Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clinical dysmorphology*. 2005; 14 (2): 61–65.
16. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, Charbonnier C, Fermey P, Belotti M, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015; 33 (21): 2345–52. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.5728>.
17. Chu DT, Vu Ngoc Suong M, Vu Thi H, Vu TD, Nguyen MH, Singh V. The expression and mutation of BRCA1/2 genes in ovarian cancer: a global systematic study. *Expert review of molecular diagnostics*. 2023; 23 (1): 53–61. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2168190>.
18. Doisne N, Grauso M, Mougénot N, Clergue M, Souil C, Coulombe A. In vivo Dominant-Negative Effect of an SCN5A Brugada Syndrome Variant. *Frontiers in physiology*. 2021; 12: 661413. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.661413>.
19. Bertolacini CD, Ribeiro-Bicudo LA, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray JC. Clinical findings in patients with GLI2 mutations — phenotypic variability. *Clinical genetics*. 2012; 81 (1): 70–75. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01606.x>.
20. Shubina J, Tolmacheva E, Maslennikov D, Kochetkova T, Mukosey I, Sadelov I, et al. WES-based screening of 7,000 newborns: A pilot study in Russia. *HGG Adv*. 2024; 10; 5 (4): 100334. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2024.100334>.

References

1. McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European journal of neurology*. 25 (1): 24–34. Available from: <https://doi.org/10.1111/ene.13413>.
2. Suetterlin K, Matthews E, Sud R, McCall S, Fialho D, Burge J, et al. Translating genetic and functional data into clinical practice: a series of 223 families with myotonia. *Brain: a journal of neurology*. 2022; 145 (2): 607–20. Available from: <https://doi.org/10.1093/brain/awab344>.
3. Chen C, Dong XP. Epidemiological characteristics of human prion diseases. *Infectious diseases of poverty*. 2016; 5 (1): 47. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0143-8>.
4. Sommen M, Schrauwen I, Vandeweyer G, Boeckx N, Comeveaux JJ, van den Ende J, et al. DNA Diagnostics of Hereditary Hearing Loss: A Targeted Resequencing Approach Combined with a Mutation Classification System. *Human mutation*. 2016; 37 (8): 812–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/humu.22999>.
5. Polgreen PM, Comellas AP. Clinical Phenotypes of Cystic Fibrosis Carriers. *Annual review of medicine*. 2022; 73: 563–74. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042120-020148>.
6. van Spronsen FJ, Blau N, Harding C, Burlina A, Longo N, Bosch AM. Phenylketonuria. *Nature reviews. Disease primers*. 2021; 7 (1): 36. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00267-0>.
7. Berntorp E, Fischer K, Hart DP, Mancuso ME, Stephensen D, Shapiro AD, et al. Haemophilia. *Nature reviews. Disease primers*. 2021; 7 (1): 45. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00278-x>.
8. Iarossi G, Coppè AM, Passarelli C, Maltese PE, Sinibaldi L, Cappelli A, et al. Blue Cone Monochromatism with Foveal Hypoplasia Caused by the Concomitant Effect of Variants in OPN1LW/OPN1MW and GPR143 Genes. *International journal of molecular sciences*. 2021; 22 (16): 8617. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms22168617>.
9. Renieri A, Meloni I, Longo I, Ariani F, Mari F, Pescucci C, Cambi F. Rett syndrome: the complex nature of a monogenic disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2003; 81 (6): 346–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0444-9>.
10. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007; 25 (11): 1329–33. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.1066>.
11. Jiao SY, Yang YH, Chen SR. Molecular genetics of infertility: loss-of-function mutations in humans and corresponding knockout/mutated mice. *Human reproduction update*. 2021; 27 (1): 154–89. Available from: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa034>.
12. Malik I, Kelley CP, Wang ET, Todd PK. Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2021; 22 (9): 589–607. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00382-6>.
13. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, et al. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2004; 114 (2): 172–81. Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI20641>.
14. Lindsay EA, Vitelli F, Su H, Morishima M, Huynh T, Pramparo T, et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature*. 2001; 410 (6824): 97–101. Available from: <https://doi.org/10.1038/35065105>.
15. Metcalfe K, Simeonov E, Beckett W, Donnai D, Tassabehji M. Autosomal dominant inheritance of Williams-Beuren syndrome in a father and son with haploinsufficiency for FKBP6. *Clinical dysmorphology*. 2005; 14 (2): 61–65.
16. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, Charbonnier C, Fermey P, Belotti M, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015; 33 (21): 2345–52. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.5728>.
17. Chu DT, Vu Ngoc Suong M, Vu Thi H, Vu TD, Nguyen MH, Singh V. The expression and mutation of BRCA1/2 genes in ovarian cancer: a global systematic study. *Expert review of molecular diagnostics*. 2023; 23 (1): 53–61. Available from: <https://doi.org/10.1080/14737159.2023.2168190>.
18. Doisne N, Grauso M, Mougénot N, Clergue M, Souil C, Coulombe A. In vivo Dominant-Negative Effect of an SCN5A Brugada Syndrome Variant. *Frontiers in physiology*. 2021; 12: 661413. Available from: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.661413>.
19. Bertolacini CD, Ribeiro-Bicudo LA, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray JC. Clinical findings in patients with GLI2 mutations — phenotypic variability. *Clinical genetics*. 2012; 81 (1): 70–75. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01606.x>.
20. Shubina J, Tolmacheva E, Maslennikov D, Kochetkova T, Mukosey I, Sadelov I, et al. WES-based screening of 7,000 newborns: A pilot study in Russia. *HGG Adv*. 2024; 10; 5 (4): 100334. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2024.100334>.