

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. Митупов, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

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

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ <https://vestnik.rsmu.press/login?lang=ru>

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2023: 0,8

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

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

Scopus[®]

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.12.2023 (№ 44) приказом
Минобрнауки России от 31.05.2023 № 534

Здесь находится открытый архив журнала

SJR
Scimago Journal & Country Rank



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2025-06

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 31.12.2025

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@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2023: 0,8



Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5



Five-year h-index is 10



SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14



Listed in HAC 31.12.2023 (No. 44) by the order of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation from 31.05.2023 No. 534



ВЫСШАЯ
АТТЕСТАЦИОННАЯ
КОМИССИЯ (ВАК)

Open access to archive



Issue DOI: 10.24075/brsmu.2025-06

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 31.12.2025

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

6

Оценка уровня катехоламинов и серотонина в крови при тревожно-депрессивных расстройствах
Н. В. Соловьева, Н. А. Чупрова, К. В. Кочергина, А. А. Митрофанов, С. В. Чаусова, И. В. Кичук

Assessment of blood catecholamine and serotonin levels in anxiety and depressive disorders
Solovyova NV, Chuprova NA, Kochergina KV, Mitrofanov AA, Chausova SV, Kichuk IV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

13

Реконсолидация ранних воспоминаний в переживаниях травматического опыта участия в боевых действиях
Е. А. Петраш, Н. Ю. Юнина-Пакулова, С. А. Курьшина, А. С. Карпенко, А. А. Кузнецова

Reconsolidation of early memories in reliving the traumatic combat experience
Petraash EA, Uynina-Pakulova NYu, Kuryishina SA, Karpenko AS, Kuznetsova AA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

22

Особенности иммунного ответа на опухолевые аллоантигены в условиях сокращенного клонального разнообразия Т-клеток
М. С. Короткова, Н. А. Персиянцева, А. А. Калинина, Л. М. Хромык, Д. Б. Казанский

Features of the immune response to tumor alloantigens in the context of decreased clonal diversity of T cells
Korotkova MS, Persiyantseva NA, Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

30

Периваскулярные мастоциты и ангиогенез в опухолевом микроокружении синовиальной саркомы

Д. В. Буланов, Д. Р. Махачев, М. А. Сунцов, Д. С. Губич, Ю. Д. Филиппова, А. А. Крутилина, А. В. Свояк, А. А. Иванникова, Р. М. Габибуллаев
Perivascular mast cells and angiogenesis in the tumor microenvironment of synovial sarcoma
Bulanov DV, Makhachev DR, Suntsov MA, Gubich DS, Filippova YD, Krutilina AA, Svoyak AV, Ivannikova AA, Ghabibullaev RM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

37

Результаты клинического исследования IIa фазы ингибитора RAS-ГТФазы («Инг-Рас») для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта
Т. М. Кулинич, Е. А. КукOLEVA, С. В. Гончаров, Е. А. Кудина, И. А. Пучков, О. И. Гончарова, В. В. Каминский, В. К. Боженко

Results of phase IIa clinical trial of the RAS-GTPase inhibitor («Ing-Ras») for treatment of gastrointestinal tumors
Kulinich TM, Kukoleva EA, Goncharov SV, Kudina EA, Puchkov IA, Goncharova OI, Kaminsky VV, Bozhenko VK

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

46

Экспрессия рецепторов хемокинов CXCR4 и CXCR7 в циркулирующих опухолевых клетках при раке молочной железы

Е. С. Григорьева, Л. А. Таширева, О. Е. Савельева, М. В. Завьялова, Н. В. Чердынцева, В. М. Перельмутер
Expression of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in circulating tumor cells of breast cancer
Grigoryeva ES, Tashireva LA, Savelieva OE, Zavyalova MV, Cherdyntseva NV, Perelmuter VM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

59

Генетические портреты Волго-Окского региона в контексте генофонда Центральной России (Y-SNP полиморфизм)

Г. Ю. Пonomarev, А. Г. Шлыков, И. О. Горин, М. М. Воронина, А. Ю. Потанина, В. А. Петров, С. М. Кошель, Д. С. Адамов, Е. В. Балановская
Genetic portraits of Volga-Oka region in the context of the Central Russia's gene pool (Y-SNP polymorphism)
Ponomarev GYu, Shlykov AG, Gorin IO, Voronina MM, Potanina AYU, Petrov VA, Koshel SM, Adamov DS, Balanovska EV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

69

Транскрипционная киназа CDK8, но не CDK19 способствует развитию атеросклеротических поражений у мышей

А. Н. Незнамов, Ю. П. Байкова, Е. Н. Коршунов, Е. М. Исаева, А. В. Брутер, М. В. Кубекина
Transcriptional kinase CDK8, but not CDK19, promotes the development of atherosclerotic lesions in mice
Neznamov AN, Baykova YuP, Korshunov EN, Isaeva EM, Bruter AV, Kubekina MV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

77

Однонуклеотидный вариант rs293795 OGG1 как генетический фактор риска диабетической нефропатии

Е. В. Семикина, Ю. Э. Азарова, С. А. Паничев, О. И. Басарева, Н. В. Джанчатова, Е. Ю. Алферова, А. В. Полоников
Single nucleotide variant rs293795 OGG1 as a genetic risk factor for diabetic nephropathy
Semikina EV, Azarova IE, Panichev SA, Basareva OI, Dzhanchatova NV, Alferova EYu, AV Polonikov

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

87

Экспрессия MTCO1 в культурах клеток пациентов с синдромом Ли при действии AAV9-SURF1

М. А. Адрианов, М. С. Готье, А. В. Дегтярева, М. В. Марей, Л. А. Манухова, С. М. Расторгуев, В. С. Симонов, Л. В. Ушакова, М. Ю. Высоких
Expression of MTCO1 in cell cultures from patients with Leigh syndrome under the action of AAV9-SURF1
Adrianov MA, Gauthier MS, Degtyareva AV, Marey MV, Manukhova LA, Rastorguev SM, Simonov VS, Ushakova LV, Vysokikh MY

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

95

Урогенитальные зонды типа Пайпель-С не предотвращают контаминацию эндометриальных образцов цервикальной микробиотой

Д. Л. Зорников, А. А. Бехтер, Д. О. Корнилов, В. М. Симарзина, Д. М. Нечаева, А. Е. Карякина, М. А. Лешукова, П. Г. Аминова, Е. С. Ворошилина
Pipelle and Endobrush Catheters Do Not Prevent Contamination of Endometrial Samples by Cervical Microbiota
Zornikov DL, Bekhter AA, Kornilov DO, Simarzina VM, Nechaeva DM, Karyakina AE, Leshukova MA, Amineva PG, Voroshilina ES

Особенности системного воспалительного статуса пациенток при эндометрит-ассоциированном бесплодии
О. Е. Савельева, Т. А. Криволезова, А. С. Жигалина, Л. П. Сигарева, А. В. Сабуров, В. А. Резник

Characteristics of systemic inflammation in patients with endometritis-associated infertility
Savelieva OE, Krivolesova TA, Zhigalina AS, Sigareva LP, Saburov AV, Reznik VA

Количество копий рибосомных генов в лейкоцитах периферической крови у женщин с физиологической и осложненной беременностью
Е. С. Ершова, Н. Н. Вейко, Э. В. Костюк, А. А. Полеткина, Т. М. Рожнова, Н. В. Низяева, Д. У. Музаффаров, П. А. Клименко, С. В. Костюк

Ribosomal gene copy number in peripheral leukocytes of women with normal and complicated pregnancy
Ershova ES, Veiko NN, Kostyuk EV, Poletkina AA, Rozhnova TM, Nizyaeva NV, Muzaffarov DU, Klimenko PA, Kostyuk SV

Подготовка и алгоритм исследования адгезированных на поверхности биокерамики клеток методом сканирующей электронной микроскопии
К. В. Данилко, В. А. Солнцев, Р. В. Плотницкий, А. В. Михайлова, А. Р. Билялов, С. С. Чугунов, М. Ф. Галаутдинов, В. Н. Акбашев, И. Ш. Ахатов

Preparation and procedure for scanning electron microscopy examination of cells adhered to bioceramic surfaces
Danilko KV, Solntsev VA, Plotnitsky RV, Mikhailova AV, Bilyalov AR, Chugunov SS, Galautdinov MF, Akbashev VN, Akhatov ISh

Разработка классификатора состояний сосудов с использованием методов контролируемого машинного обучения
Э. В. Беседовская, А. Ю. Коробов, Н. И. Кудряшова

Development of the vascular condition classifier using supervised machine learning methods
Besedovskaja ZV, Korobov AYU, Kudriashova NI

Детекция *Salmonella enterica* петлевой изотермальной амплификацией ДНК с использованием флуоресцентно меченого петлевого праймера
Д. В. Шамовская, М. А. Гордукова, М. А. Смертина, Е. В. Галеева, И. П. Оскорбин, Е. А. Храпов, У. А. Боярских, М. Л. Филипенко

Detection of *Salmonella enterica* by loop-mediated isothermal amplification of DNA using a fluorescently labeled loop primer
Shamovskaya DV, Gordukova MA, Smertina MA, Galeeva EV, Oskorbin IP, Khrapov EA, Boyarskikh UA, Filipenko ML

Противоописторхозная и гепатопротекторная активность экстракта коры осины (*Populus tremula L.*) в экспериментах *in vitro*
Е. А. Перина, Е. Е. Буйко, О. А. Кайдаш, Л. В. Ефимова, Е. Б. Диксас, С. В. Кривошеков, А. А. Иванов, В. В. Иванов, Е. В. Удут

Anti-opisthorchiasis and hepatoprotective effects of *Populus tremula* bark extract: *in vitro* studies
Perina EA, Buyko EE, Kaidash OA, Efimova LV, Dikhas EB, Krivoshechekov SV, Ivanov AA, Ivanov VV, Udut EV

Экспрессия эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в крови больных разными формами метаболически ассоциированной жировой болезни печени
Г. А. Жулай И. В. Курбатова, О. П. Дуданова

Blood expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases in patients with various forms of metabolic-associated fatty liver disease
Zhulai GA, Kurbatova IV, Dudanova OP

Противовирусная активность мРНК, кодирующих внутриклеточные scFv-фрагменты антител к консервативным эпитопам вируса гриппа
М. А. Плотникова, В. А. Олейник, С. А. Клотченко

Antiviral activity of mRNAs encoding intracellular scFv antibodies against conserved influenza virus epitopes
Plotnikova MA, Oleynik VA, Klotchenko SA

HMGB1 и анти-HMGB1 антитела при системной красной волчанке и других ревматических заболеваниях
М. М. Меламуд, Е. А. Ермаков, А. С. Толмачева, А. Э. Сизиков, Н. А. Кляус, Г. А. Невинский, В. Н. Бунева

HMGB1 and anti-HMGB1 antibodies in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases
Melamud MM, Ermakov EA, Tolmacheva AS, Sizikov AE, Klyaus NA, Nevinsky GA, Buneva VN

Фолликулярные Т-клетки периферической крови: нарастающая сложность и первоочередные вопросы
И. Л. Григорова

Follicular T cells in peripheral blood: increasing complexity and key questions
Grigorova IL

Этиологическая структура энтеровирусной инфекции у детей в Московском регионе

В. А. Полякова, Е. Е. Давыдова, А. Р. Лупарев, А. Д. Мацвай, Н. И. Гнусарева, М. А. Гордукова, Е. В. Галеева, А. А. Толоконцева, Г. А. Шипулин

Etiological structure of enterovirus infection in children in the Moscow region

Polyakova VA, Davydova EE, Luparev AR, Matsvay AD, Gnusareva NI, Gordukova MA, Galeeva EV, Tolokonceva AA, Shipulin GA

Сравнительная визуализация связывания тетрапептидов HAEE-Cy5 и EEAH-Cy5 с агрегатами A β на клетках SH-SY5Y

A. B. Иванова, Н. С. Чмелюк, И. А. Кузьмичев, М. И. Шилияева, М. А. Абакумов

Comparative imaging of the HAEE-Cy5 and EEAH-Cy5 tetrapeptide binding to the A β aggregates on the SH-SY5Y cells

Ivanova AV, Chmelyuk NS, Kuzmichev IA, Shilyaeva MI, Abakumov MA

Определение мишеней для персонализированной мультитаргетной неинвазивной стимуляции лобно-теменной сети контроля

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

Determining targets for personalized multitarget noninvasive stimulation of the frontoparietal control network

Poydasheva AG, Sinityn DO, Bakulin IS, Zabiroya AH, Lagoda DYu, Suponeva NA, Piradov MA

Дифференцировка ИПСК в предшественники эпителия роговицы в трехмерных условиях *in vitro*

Е. Б. Жигмитова, А. В. Косых, Н. Г. Гурская

Differentiation of iPSCs into corneal epithelial precursors in three-dimensional *in vitro* culture

Zhigmitova EB, Kosykh AV, Gurskaya NG

Разработка и исследование материала на основе костного аллотрансплантата для DLP-3D-печати

A. P. Билялов, С. С. Чугунов, И. Ш. Ахатов, А. А. Тихонов, О. Р. Шангина, В. Н. Павлов, К. В. Данилко, М. Ф. Галаутдинов, В. Н. Акбашев

Development and assessment of the bone allograft-based material for DLP 3D printing

Bilyalov AR, Chugunov SS, Akhatov ISh, Tikhonov AA, Shangina OR, Pavlov VN, Danilko KV, Galautdinov MF, Akbashev VN

Экспрессия микроРНК miR146a в плазме крови крыс с ожирением и артрозом коленного сустава на фоне введения дексаметазона

A. С. Иванов, Т. П. Тананакина, С. А. Кашченко, И. А. Погорелова

Expression of microRNA miR146a in the blood plasma of rats with obesity and knee arthrosis after administration of dexamethasone

Ivanov AS, Tananakina TP, Kashchenko SA, Pogorelova IA

Клинический случай острого тяжелого отравления α -PVP, осложненный развитием синдрома системного рабдомиолиза

Н. П. Макаровская, А. Н. Лодягин, Ч. Б. Батоцыренов, С. Ю. Разамасова, А. М. Антонова, Р. А. Нарзикулов, Е. С. Соколова

Severe acute α -PVP poisoning complicated by systemic rhabdomyolysis syndrome: case report

Makarovskaya NP, Lodyagin AN, Batocyrenov ChB, Razamasova SYu, Antonova AM, Narzikulov RA, Sokolova ES

Почвенные черви как источник новых подходов в биомедицинских исследованиях

A. Н. Хохлова, М. В. Вавилов, Т. В. Чепурных, Н. С. Родионова, В. Н. Петушков, И. В. Ямпольский, М. А. Дубинный

Earthworms as a source of new approaches in biomedical research

Khokhlova AN, Vavilov MV, Chepurnykh TV, Rodionova NS, Petushkov VN, Yampolsky IV, Dubinnyi MA

ОЦЕНКА УРОВНЯ КАТЕХОЛАМИНОВ И СЕРОТОНИНА В КРОВИ ПРИ ТРЕВОЖНО-ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВАХ

Н. В. Соловьева¹, Н. А. Чупрова¹, К. В. Кочергина², А. А. Митрофанов³, С. В. Чаусова⁴, И. В. Кичук⁴ ✉

¹ Научный центр персонализированной медицины, Москва, Россия

² Лечебно-диагностический центр Международного института биологических систем «Столица», Москва, Россия

³ Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

В психиатрической практике существует необходимость разработки простых, патогенетически обоснованных и надежных биомаркеров для прогноза аффективного статуса пациентов в текущий момент и в ближайшей перспективе. Целью работы было провести анализ ассоциации аффективного статуса пациентов с непсихотическими расстройствами с уровнями катехоламинов и серотонина в периферической крови. Для оценки аффективного статуса использовали Госпитальную шкалу тревоги и депрессии (HADS). Концентрацию катехоламинов (адреналина, норадреналина и дофамина) в плазме и серотонина в сыворотке крови оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В исследование вошли 114 человек с непсихотическими расстройствами, средний возраст составил 34,57 (SD = 10,36) лет, доля женщин — 64%. Мы не выявили достоверных прогностических эффектов уровней нейромедиаторов в периферической крови в отношении текущего аффективного статуса. Единственным маркером на уровне тенденции оказалось соотношение «серотонин / норадреналин», повышение значения которого снижает риск статуса клинической депрессии по HADS-D с учетом пола и возраста пациентов ($p = 0,059$). У пациентов с диагнозом рекуррентное депрессивное расстройство или депрессивный эпизод отмечено небольшое снижение уровня серотонина ($p = 0,068$) по сравнению с пациентами с диагнозами вне категории аффективных расстройств. В этой же группе обнаружена отрицательная корреляция между баллами по HADS-A (тревога) и уровнем норадреналина ($R_s = -0,410$, $p < 0,05$). Полученные результаты дают основания предполагать, что на расширенных клинически гомогенных выборках будет возможность подтверждения полученных предварительных результатов и получения новых данных.

Ключевые слова: депрессия, тревога, непсихотические психические расстройства, катехоламины, серотонин, биологические маркеры

Вклад авторов: Н. В. Соловьева, И. В. Кичук — концепция и дизайн исследования; Н. В. Соловьева, К. В. Кочергина, А. А. Митрофанов, И. В. Кичук — сбор и обработка материала; Н. А. Чупрова, К. В. Кочергина — статистическая обработка данных; А. А. Митрофанов, И. В. Кичук, Н. В. Соловьева, К. В. Кочергина — написание текста; А. А. Митрофанов, И. В. Кичук, Н. В. Соловьева, К. В. Кочергина, С. В. Чаусова — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Акционерного общества «Научный центр персонализированной медицины» (протокол № 33 от 01 декабря 2025 г.). Персональные данные участников были скрыты при проведении исследования. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ирина Викторовна Кичук
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 119021, Россия; mail2irina@mail.ru

Статья получена: 30.10.2025 **Статья принята к печати:** 08.12.2025 **Опубликована онлайн:** 19.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.080

ASSESSMENT OF BLOOD CATECHOLAMINE AND SEROTONIN LEVELS IN ANXIETY AND DEPRESSIVE DISORDERS

Solovyova NV¹, Chuprova NA¹, Kochergina KV², Mitrofanov AA³, Chausova SV⁴, Kichuk IV⁴ ✉

¹ Scientific Centre of Personalized Medicine, Moscow, Russia

² Diagnostic and Treatment Center, Berezin Medical Institute, Moscow, Russia

³ Mental Health Research Center, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In psychiatric practice, there is a need to develop simple, pathogenetically substantiated biomarkers for prediction of the patient's current affective status and his/her status short-term perspective. The study aimed to analyze the association of the affective status of patients with mood disorders with the peripheral blood catecholamine and serotonin levels. The Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) was used for affective status evaluation. Concentrations of catecholamines (adrenaline, norepinephrine, and dopamine) in blood plasma and serotonin in blood serum were assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The study included 114 individuals with affective disorders, the average age was 34.57 (SD = 10.36) years, the share of females was 64%. We revealed no significant prognostic effects of peripheral blood neurotransmitter levels relative to the current affective status. The serotonin/norepinephrine ratio, the increase in which significantly decreases the risk of clinical depression according to HADS-D considering the patient's sex and age ($p = 0.059$), turned out to be the only marker at the level of trends. In patients diagnosed with recurrent depressive disorder or depressive episode, a slight decrease in serotonin levels ($p = 0.068$) compared to the patients diagnosed with the disorders beyond the category of mood disorders is reported. In the same group a negative correlation has been found between the HADS-A scores (anxiety) and norepinephrine levels ($R_s = -0.410$, $p < 0.05$). The findings suggest that it will be possible to confirm the preliminary results obtained and acquire new data in the expanded clinically homogenous samples.

Keywords: depression, anxiety, non-psychotic mental disorders, catecholamines, serotonin, biological markers

Author contribution: Solovyova NV, Kichuk IV — study concept and design; Solovyova NV, Kochergina KV, Mitrofanov AA, Kichuk IV — material collection and processing; Chuprova NA, Kochergina KV — statistical data processing; Mitrofanov AA, Kichuk IV, Solovyova NV, Kochergina KV — manuscript writing; Mitrofanov AA, Kichuk IV, Solovyova NV, Kochergina KV, Chausova SV — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Joint Stock Company "Scientific Centre of Personalized Medicine" (protocol No. 33 dated 1 December 2025). The subjects' personal data were hidden during the study. All the subjects submitted the informed consent for participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Kichuk
Ostrovityanova, 1, Moscow, 119021, Russia; mail2irina@mail.ru

Received: 30.10.2025 **Accepted:** 08.12.2025 **Published online:** 19.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.080

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о психическом здоровье, более миллиарда человек в мире страдает психическими расстройствами, при этом существенная доля среди психических нарушений приходится на аффективные расстройства, включающие как депрессивные, так и тревожные расстройства [1].

Депрессия — хроническое рецидивирующее психическое заболевание, манифестирующее чаще всего в молодом и среднем возрасте и существенно влияющее на качество жизни и социальное функционирование пациентов. Депрессия играет наиболее значимую роль в структуре глобального бремени заболеваний среди психической патологии и, по прогнозу ВОЗ, к 2030 г. станет одной из ведущих причин инвалидизации и смертности [2]. Эти прогнозы основаны на высокой распространенности депрессии: в течение жизни заболевание отмечается у 19% общей популяции, а в целом затрагивает более 350 млн человек по всему миру [2]. Кроме того, от 30 до 50% здоровых людей испытывают субклиническую депрессию, которая не соответствует диагностическим критериям для расстройств настроения, но тем не менее связана с риском формирования в течение жизни клинически значимой патологии [3].

В совокупности, средняя ожидаемая продолжительность жизни у пациентов с депрессией снижена более чем на 10 лет [4].

С депрессией связан высокий риск суицида — второй наиболее частой причины смертности в возрасте 15–29 лет. Ежегодно в результате суицида в мире погибает около 800 тыс. человек [2]. Данные ВОЗ свидетельствуют, что 2/3 людей, совершивших суицидальную попытку, имели депрессивные проявления. 21% пациентов, страдающих депрессивным расстройством, совершают суицидальные попытки, из которых значительная часть завершённых [5].

Симптомы депрессии являются важным элементом многих психических расстройств и составляют значимую часть клинической картины, хотя могут и не достигать клинически значимого диагностического уровня. Депрессия и тревога имеют тенденцию агрегироваться в семьях и часто перекрываются между собой, что также подтверждается результатами современных полногеномных исследований. С клинической точки зрения, сочетание депрессии и тревоги ассоциировано с более тяжелым течением и худшим ответом на антидепрессивную терапию [6].

В реальной клинической практике при лечении пациента с непсихотическими психическими расстройствами для врача-психиатра на первый план выходит его текущий аффективный статус. Очевидна необходимость разработки простых, патогенетически обоснованных и надежных биологических маркеров, использование которых могло бы дать врачу устойчивые ориентиры для прогноза аффективного статуса в ближайшей перспективе [7].

Таковыми маркерами могут выступать в том числе уровни катехоламинов и серотонина, оцениваемые периферически, например, при анализе крови пациента.

Считается, что серотонин и катехоламины играют важную роль в патогенезе депрессии и тревоги [8–10], связаны с уровнем тяжести течения заболеваний [10], а также модулируют ответ на терапию аффективных расстройств [11].

Ранее мы проводили анализ связи уровней серотонина с клиническим статусом пациентов с депрессией [12, 13].

С учетом трансдиагностического характера симптомов депрессии и тревоги [14], а также важной роли катехоламинов и серотонина в патогенезе большинства психических расстройств представляется адекватным провести

анализ связи текущего аффективного статуса и уровней нейромедиаторов. Большинство исследований фокусируется на анализе уровней нейромедиаторов как маркеров эффективности терапии [11, 15], а также как маркеров статуса заболевания в рамках исследований «случай–контроль» [16, 17] и в рамках развития известной «кинурениновой гипотезы» этиологии и патогенеза психических расстройств [18].

В настоящем исследовании мы предположили, что уровни нейромедиаторов (катехоламинов и серотонина) в периферической крови могут быть связаны с текущим аффективным статусом у пациентов с непсихотическими психическими расстройствами и могут выступать как биомаркеры выраженности симптомов тревоги и депрессии, а также могут быть использованы для прогноза актуального аффективного статуса пациента.

Цель работы — анализ ассоциации аффективного статуса пациентов с аффективными расстройствами с уровнями катехоламинов и серотонина в периферической крови.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследовании приняли участие амбулаторные пациенты с непсихотическими психическими расстройствами, обратившиеся за медицинской помощью в АО «Персонализированная медицина» (г. Москва) в возрасте 18–65 лет. Критерии включения: наличие диагностированного в течение последнего месяца психиатром расстройства в соответствии с критериями МКБ-10: биполярное аффективное расстройство, текущий эпизод легкой или умеренной депрессии (F31.3), депрессивный эпизод (F32), рекуррентное депрессивное расстройство (F33), дистимия (F34.1), другие рекуррентные расстройства настроения (F38.1), другие тревожные расстройства (F41), обсессивно-компульсивное расстройство (F42), соматоформное расстройство (F45). Критерии исключения: расстройства шизофренического спектра, психотический уровень биполярного аффективного расстройства, зависимость от психоактивных веществ, хронические соматические заболевания в стадии обострения, судорожные припадки в анамнезе.

Психометрические исследования

Для оценки текущего аффективного статуса участников исследования использовали Госпитальную шкалу тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale, HADS) [19], применяли русскоязычную версию HADS [20]. Шкала имеет две независимых оси: симптомы депрессии (HADS-D) и симптомы тревоги (HADS-A). Градация шкалы: 0–7 баллов — отсутствие симптомов тревоги или депрессии, 8–10 баллов — субклинические проявления тревоги или депрессии, 10 и более баллов — клинические проявления тревоги или депрессии. На основе индивидуальных баллов HADS фиксировали статус пациента согласно градациям, а также соотношение баллов тревога/депрессия (Т/Д) как отношение балла тревоги (HADS-A к баллу депрессии (HADS-D).

Биохимические исследования

Были произведены оценки концентрации катехоламинов (адреналин, норадреналин и дофамин) в плазме крови,

Таблица 1. Сравнение пациентов с клинической тревогой по HADS-A с прочими пациентами

	Клиническая тревога HADS-A			Прочие (норма и субклиническая тревога) HADS-A			U	p
	n = 92			n = 22				
	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)		
Возраст (лет)	35,53	10,036	33,5 (28; 43)	32,24	11,09	30 (23; 35)	797,5	0,123
Серотонин (СЕР), нг/мл	117,72	78,33	95,2 (56; 184,25)	95,68	65,99	81 (44,21; 125,1)	899,5	0,419
Дофамин (ДА), нг/мл	44,31	56,69	34,62 (16,9; 53)	43,4	47,19	30 (15; 44,5)	860,5	0,525
Адреналин (А), нг/мл	52,34	50,9	37,2 (23; 68,5)	43,18	39,55	33,39 (26,5; 46,2)	832,5	0,397
Норадреналин (НА), нг/мл	346,56	183,21	319,6 (223; 432)	323,73	213,02	279 (186; 389)	811,5	0,315
Серотонин/Дофамин (СЕР/ДА)	5,5	5,71	3,69 (1,57; 7,13)	6,3	10,96	2,93 (1,21; 7,36)	898	0,723
Серотонин/Норадреналин	0,626	1,5	0,329 (0,18; 0,58)	0,357	0,24	0,29 (0,16; 0,63)	870	0,572
Серотонин/Адреналин	4,015	4,73	2,41 (1,43; 5,48)	3,959	5,524	1,93 (1,06; 4,09)	857	0,508
Норадреналин/Дофамин	16,57	16,92	9,27 (5,68; 20,91)	21,66	38,56	9,42 (6,53; 16,09)	930	0,91
Норадреналин/Адреналин	11,82	10,93	7,9 (3,94; 15,92)	11,48	9,45	7,98 (4,69; 18,68)	907	0,775
Адреналин/Дофамин	2,17	1,75	1,34 (0,77; 2,36)	2	2,08	1,4 (0,78; 2,56)	940	0,97

Примечание: p — асимптотическая значимость (двухсторонняя), U-критерий Манна-Уитни.

а также серотонина в сыворотке крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Забор крови производили натощак в день анкетирования, для анализа образцы отправляли в лабораторию «Хромолаб» (Москва, Россия). В анализе использовали как непосредственно уровни нейромедиаторов, так и их соотношения (серотонин/дофамин, серотонин/норадреналин, серотонин/адреналин, норадреналин/дофамин, норадреналин/адреналин, адреналин/дофамин), которые могут быть информативными косвенными индикаторами состояния нейромедиации.

Дизайн исследования

Исследование было кросс-секционным, сравнительным. Вся информация о пациенте была получена в ходе однократного визита. Для оценки ассоциации текущего аффективного статуса с уровнями нейромедиаторов были выделены группы по текущему аффективному статусу на основе баллов (HADS-D) и (HADS-A) независимо от клинического диагноза, и эти группы сравнивали между собой по уровням биохимических показателей. Проводили корреляционный анализ связи биохимических показателей и баллов по (HADS-D) и (HADS-A), а также регрессионный анализ оценки прогноза баллов (HADS-D) и (HADS-A) на основе биохимических показателей.

На втором этапе провели сравнение диагностических групп пациентов (депрессия, тревога, прочие) между собой по уровням биохимических показателей для оценки возможной связи диагноза и уровней нейромедиаторов. При обнаружении достоверных различий между группами были построены регрессионные модели с коррекцией на пол и возраст.

Статистическая обработка

Статистический анализ проведен с использованием SPSS 23.0. Большинство переменных исследования не имело нормального распределения (критерий Колмогорова-Смирнова), в связи с этим применяли непараметрические методы. Для сравнения групп по количественным переменным использовали непараметрический критерий U Манна-Уитни. Для оценки факторов прогноза клинической депрессии/тревоги на основе баллов HADS использовали метод

логистической регрессии (пошаговый) с бинарным вариантом зависимой переменной (есть/нет) с корректировкой на пол и возраст. Для оценки возможности прогноза баллов (HADS-D) и (HADS-A) на основе уровней нейромедиаторов проведена линейная регрессия.

Для оценки корреляционных связей между баллами (HADS-D) и (HADS-A), а также соотношения Т/Д и концентрацией катехоламинов и серотонина использовали корреляционный анализ Спирмена в общей когорте, а также в диагностических группах.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 114 человек, средний возраст составил 34,57 (SD = 10,36) лет, доля женщин — 64% (73 человека). Средний балл выборки по (HADS-D) — 14,83 (SD = 4,752); по (HADS-A) — 19,29 (SD = 7,397).

Текущий аффективный статус

Для дальнейшего анализа выборка была разделена на группы по наличию депрессии и тревоги по HADS. Обнаружено, что в выборке только пять участников с баллами HADS-A менее 7 (0–7) («норма»), и шесть участников с баллами HADS-D менее 7 (0–7) («норма»). В связи с этим дальнейший анализ проводили в двух группах сравнения: «Клиническая депрессия / тревога» и группа «Прочие» (норма и субклиническая депрессия / тревога). Анализ проводили независимо для тревоги и депрессии.

Пациенты с клинической тревогой (HADS-A) составили 80,7% выборки (92 человека) и не отличались от прочих пациентов по возрасту и уровням нейромедиаторов и их соотношениям (табл. 1).

Пациенты с клинической депрессией (HADS-D) составили 75,4% (86 человек) когорты и имели тенденцию к более низкому среднему значению соотношения серотонин/норадреналин (0,39 (0,38)) по сравнению с группой «Прочие» (1,19 (2,66), $p = 0,084$) (табл. 2).

Далее была построена регрессионная модель для прогноза статуса клинической депрессии с включением соотношения серотонин/норадреналин и взаимодействия с полом, клинических диагнозов, а также возраста и пола как ковариат, объясняющая 20,8% дисперсии (R-квадрат Нэйджелкерка = 0,208) и предсказывающая 78,2%

Таблица 2. Сравнение пациентов с клинической депрессией по HADS-D с прочими пациентами

	Клиническая депрессия HADS-D $n = 86$			Прочие (норма и субклиническая депрессия) HADS-D $n = 28$			U	p
	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)		
Возраст (лет)	35,15	10,183	33 (27; 43)	34,12	10,727	31,5 (28,75; 40)	1097	0,481
Серотонин, нг/мл	111,16	75,15	88,11 (56; 178)	121,36	81,24	95,2 (48,57; 181,75)	1137,5	0,662
Дофамин, нг/мл	39,44	34,34	32,9 (17,1; 49,1)	59,5	94,56	30,65 (11,23; 58,73)	1074	0,829
Адреналин, нг/мл	46,67	35,52	36,95 (24,4; 65)	63,49	77,9	36,5 (17,58; 79,75)	1071	0,813
Норадреналин, нг/мл	354,96	177,54	315 (243,25; 470,57)	300,67	218,84	293,49 (140,6; 388,2)	885,5	0,126
Серотонин/Дофамин	4,9	5,28	3,35 (1,3; 6,1)	8,11	10,52	4,9 (1,73; 10,05)	922	0,203
Серотонин/Норадреналин	0,39	0,38	0,3 (0,17; 0,52)	1,19	2,66	0,41 (0,22; 0,8)	857	0,084
Серотонин/Адреналин	4,04	5,19	2,1 (1,47; 4,9)	3,89	3,65	3,14 (0,99; 5,98)	1082	0,873
Норадреналин/Дофамин	16	16,13	9,93 (5,9; 17,7)	22,55	36,3	7,04 (4,4; 35,9)	1032	0,611
Норадреналин/Адреналин	12,39	11,07	8,77 (4,6; 16,1)	9,7	8,9	5,76 (3,4; 18,2)	889	0,133
Адреналин/Дофамин	1,97	2,19	1,25 (0,7; 2,3)	2,71	3,59	1,59 (0,9; 2,6)	948	0,274

Примечание: p — асимптотическая значимость (двухсторонняя), U -критерий Манна–Уитни.

вероятного исхода. Выявлено, что наличие симптомов тревоги по шкале HADS-A ($p = 0,011$) и повышение значения соотношения серотонин/норадреналин ($p = 0,059$, тренд) независимо снижают риск статуса клинической депрессии по HADS-D с учетом пола и возраста пациентов (табл. 3).

Сравнение диагностических групп

Для дальнейшего анализа когорту пациентов разделили на основании клинического диагноза (депрессия, тревога и прочие) и провели попарное сравнение диагностических групп по биохимическим показателям. Диагностическая группа «Депрессия» (РДР, депрессивный эпизод) составила

29,8% выборки (34 участника), «Тревога» (тревожные расстройства) — 41,2% (47 участников), «Прочие» (остальные диагнозы) — 28,9% (33 участника).

Не выявлено различий по уровням нейромедиаторов и их соотношениям между диагностическими группами «Депрессия» и «Тревога» (табл. 4) и «Тревога» и «Прочие» (табл. 5). В группе «Депрессия» средний уровень серотонина имеет тенденцию к снижению ($p = 0,068$) по сравнению с группой «Прочие» (табл. 6), однако регрессионный анализ не подтвердил этот результат.

Анализ корреляционных связей между баллами по HADS-D и HADS-A с уровнями нейромедиаторов в общей когорте пациентов не выявил достоверных

Таблица 3. Результаты регрессионного анализа прогноза клинической депрессии (HADS-D)

	B	SE	Вальд	ст.св.	p	Exp (B)	95% доверительный интервал для EXP (B)	
							Нижняя	Верхняя
Серотонин/Норадреналин	-0,948	0,502	3,569	1	0,059	0,387	0,145	1,036
Клинический диагноз депрессия	-0,81	0,826	0,962	1	0,327	0,445	0,088	2,244
Клинический диагноз тревога	-1,877	0,734	6,546	1	0,011	0,153	0,036	0,645
Константа	2,838	0,751	14,27	1	0	17,085		

Примечание: SE — среднеквадратичная ошибка. Характеристики модели: $X^2 = 16,398$, $p = 0,001$; -2 Log-правдоподобие = 103,909.

Таблица 4. Сравнение пациентов с клиническими диагнозами депрессия и тревога по биохимическим показателям

	Депрессия $n = 34$			Тревога $n = 47$			U	p
	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)		
Возраст	34,5	11,67	32,5 (25,5; 39,5)	35,87	10,04	33,5 (28; 44,25)	705	0,368
Серотонин, нг/мл	100,81	70,31	76,84 (43,6; 171)	105,64	67,44	91,55 (50; 169,75)	748	0,625
Дофамин, нг/мл	44,32	49,82	30,5 (15,65; 46,84)	41,15	42,04	35 (18; 53)	685	0,604
Адреналин, нг/мл	40,06	32,67	32,24 (25,25; 44,24)	61,76	66,14	47,1 (17,72; 76,5)	607,5	0,192
Норадреналин, нг/мл	329,95	184,71	306,1 (207,1; 379,6)	341,05	196,75	310 (214,75; 422,5)	720	0,871
Серотонин/Дофамин	5,83	9,29	3,14 (1,12; 6,43)	4,75	4,53	3,45 (1,59; 7,13)	732	0,968
Серотонин/Норадреналин	0,34	0,22	0,3 (0,16; 0,49)	0,64	1,84	0,28 (0,18; 0,52)	713	0,815
Серотонин/Адреналин	4,11	4,94	1,95 (1,06; 6,08)	3,9	5,79	2,14 (1; 4,8)	723	0,895
Норадреналин/Дофамин	20,37	32,8	10,03 (6,25; 16,4)	15,11	15,29	8,86 (5,65; 18,18)	697	0,692
Норадреналин/Адреналин	11,5	8,17	9,22 (4,58; 15,7)	11,6	11,6	6,78 (3,84; 17,87)	646	0,361
Адреналин/Дофамин	1,84	1,96	1,16 (0,66; 2,27)	2,35	3,07	1,38 (0,79; 2,43)	666,5	0,48

Примечание: p — асимптотическая значимость (двухсторонняя), U -критерий Манна–Уитни.

Таблица 5. Сравнение пациентов с клиническими диагнозами тревога и прочие по биохимическим показателям

	Тревога <i>n</i> = 47			Прочие <i>n</i> = 32			<i>U</i>	<i>p</i>
	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)		
Возраст	35,87	10,04	33,5 (28; 44,25)	34,19	9,38	33 (27,3; 42,8)	710	0,675
Серотонин, нг/мл	105,64	67,44	91,55 (50; 169,75)	134,99	90,43	103,79 (61,1; 194)	628,5	0,217
Дофамин, нг/мл	41,15	42,04	35 (18; 53)	49,33	74,4	36,87 (13,21; 56,5)	712	0,807
Адреналин, нг/мл	61,76	66,14	47,1 (17,72; 76,5)	45,19	27,33	37,73 (25; 69,75)	695,5	0,681
Норадреналин, нг/мл	341,05	196,75	310 (214,75; 422,5)	356,48	187,74	344 (208,48; 483)	685	0,604
Серотонин/Дофамин	4,75	4,53	3,45 (1,59; 7,13)	6,27	6,72	4,2 (1,59; 8,72)	654	0,405
Серотонин/Норадреналин	0,64	1,84	0,28 (0,18; 0,52)	0,71	1,22	0,4 (0,19; 0,71)	641	0,335
Серотонин/Адреналин	3,9	5,79	2,14 (1; 4,8)	4,04	3,26	2,55 (1,62; 6,17)	609	0,197
Норадреналин/Дофамин	15,11	15,29	8,86 (5,65; 18,18)	17,59	18,72	8,36 (5,6; 30,8)	710	0,792
Норадреналин/Адреналин	11,6	11,6	6,78 (3,84; 17,87)	12,4	11,71	7,95 (4,02; 19,37)	692	0,655
Адренолин/Дофамин	2,35	3,07	1,38 (0,79; 2,43)	2,04	2,38	1,43 (0,73; 2,5)	689,5	0,637

Примечание: *p* — асимптотическая значимость (двухсторонняя), *U*-критерий Манна–Уитни.

корреляций. Этот же анализ отдельно в диагностических подгруппах выявил единственную корреляцию (HADS-A)–норадреналин в диагностической группе «Прочие» ($R_s = -0,410$, $p < 0,05$). Согласно результатам линейной регрессии с коррекцией на пол и возраст в общей когорте пациентов, уровни нейромедиаторов и их соотношения не прогнозируют баллы по HADS-A ($F = 0,573$, $p = 0,751$) и HADS-D ($F = 0,434$, $p = 0,854$), а также соотношение Т/Д ($F = 0,814$, $p = 0,561$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наиболее достоверным показателем нарушения обмена серотонина в центральной нервной системе считается наличие тромбоцитарного серотонина. Тромбоциты рассматриваются в качестве экстрацеребральной модели серотонинергических нейронов. Была выявлена высокодостоверная корреляция содержания серотонина в тромбоцитах и цереброспинальной жидкости [22].

Серотонин сыворотки крови в основном является тромбоцитарным серотонином, и его изменение позволяет дать косвенную оценку активности серотонинергической системы головного мозга, в связи с чем именно серотонин сыворотки крови был выбран нами для исследования.

В нашем исследовании в небольшой когорте пациентов с непсихотическими психическими расстройствами мы не выявили достоверных прогностических эффектов уровней нейромедиаторов (катехоламины и серотонин) в периферической крови в отношении текущего аффективного статуса. Единственным маркером на уровне тенденции оказалось соотношение «серотонин/норадреналин», повышение значения которого снижает риск статуса клинической депрессии по HADS-D с учетом пола и возраста пациентов ($p = 0,059$). Также в группе пациентов с диагнозом рекуррентное депрессивное расстройство или депрессивный эпизод отмечено небольшое снижение уровня серотонина ($p = 0,068$) по сравнению с пациентами с психиатрическими диагнозами вне категории аффективных расстройств. Интересно, что именно в этой группе мы обнаружили единственную корреляцию между баллами по HADS-A (тревога) и уровнем норадреналина ($R_s = -0,410$, $p < 0,05$): чем выше уровень тревоги, тем ниже уровень норадреналина.

Проведенное исследование является первым в подобном дизайне и нет возможностей прямого сравнения результатов с предыдущими исследованиями. Связь выраженности тревоги и функционирования систем стрессорного реагирования, в частности вегетативной

Таблица 6. Сравнение пациентов с клиническими диагнозами депрессия и «Прочие» по биохимическим показателям

	Депрессия <i>n</i> = 34			Прочие <i>n</i> = 32			<i>U</i>	<i>p</i>
	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)	Среднее значение	SD	Me (Q ₁ ; Q ₃)		
Возраст	34,5	11,67	32,5 (25,5; 39,5)	34,19	9,38	33 (27,3; 42,8)	503	0,599
Серотонин, нг/мл	100,81	70,31	76,84 (43,6; 171)	134,99	90,43	103,79 (61,1; 194)	402	0,068
Дофамин, нг/мл	44,32	49,82	30,5 (15,65; 46,84)	49,33	74,4	36,87 (13,21; 56,5)	471	0,582
Адреналин, нг/мл	40,06	32,67	32,24 (25,25; 44,24)	45,19	27,33	37,73 (25; 69,75)	438,5	0,324
Норадреналин, нг/мл	329,95	184,71	306,1 (207,1; 379,6)	356,48	187,74	344 (208,48; 483)	441,5	0,344
Серотонин/Дофамин	5,83	9,29	3,14 (1,12; 6,43)	6,27	6,72	4,2 (1,59; 8,72)	447,5	0,386
Серотонин/Норадреналин	0,34	0,22	0,3 (0,16; 0,49)	0,71	1,22	0,4 (0,19; 0,71)	411	0,175
Серотонин/Адреналин	4,11	4,94	1,95 (1,06; 6,08)	4,04	3,26	2,55 (1,62; 6,17)	426	0,248
Норадреналин/Дофамин	20,37	32,8	10,03 (6,25; 16,4)	17,59	18,72	8,36 (5,6; 30,8)	493	0,799
Норадреналин/Адреналин	11,5	8,17	9,22 (4,58; 15,7)	12,4	11,71	7,95 (4,02; 19,37)	477	0,638
Адренолин/Дофамин	1,84	1,96	1,16 (0,66; 2,27)	2,04	2,38	1,43 (0,73; 2,5)	488	0,747

Примечание: *p* — асимптотическая значимость (двухсторонняя), *U*-критерий Манна–Уитни.

регуляции с активным вовлечением норадренергических механизмов, хорошо известна [21], и наши результаты подтверждают эти представления. Соотношение серотонин/норадреналин может косвенно отражать с известными ограничениями взаимодействие вегетативных механизмов (норадреналин) и систем эмоциональной регуляции (серотонин) и тот факт, что мы получили подтверждение влияния этого маркера на аффективный статус вне зависимости от формального психиатрического диагноза, может быть серьезным основанием для продолжения исследований в этом направлении на расширенных выборках.

Ограничения исследования

Представленное пилотное исследование выполнено на небольших по объему выборках участников, что существенно ограничивает возможности интерпретации результатов. Задачей исследования было оценить связь уровней нейромедиаторов с аффективным статусом. Оценку аффективного статуса проводили с помощью простой скрининговой шкалы-самопросника HADS, без использования клинических психометрических

инструментов. Шкалу HADS успешно применяют для целей скрининга симптомов депрессии и тревоги во всем мире и в нашей стране. Недавно шкала HADS была протестирована в рамках большого популяционного онлайн-исследования депрессии в российской популяции [23] и была проведена корректная валидация этой шкалы в российской общей популяции [24].

Выводы

В рамках предварительного пилотного исследования на смешанной когорте пациентов не было обнаружено значимых ассоциаций между текущим аффективным статусом пациента и уровнем катехоламинов и серотонина в периферической крови. Однако выявлен эффект уровня норадреналина и соотношения «серотонин/норадреналин» в отношении аффективного статуса для пациентов с клинической депрессией. Это дает основания предполагать, что на следующем этапе исследования с использованием расширенных и более гомогенных выборок будет возможность подтвердить предварительные результаты и получить новые данные.

Литература

1. WHO. World mental health report: Transforming mental health for all. 2022.
2. World Health Organization. The Global Burden of Disease. [cited 2024 Mar 24]. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html.
3. Lewinsohn PM, Shankman SA, Gau JM, Klein DN. The prevalence and co-morbidity of subthreshold psychiatric conditions. *Psychol Med.* 2004; 34 (4): 613–22. DOI: 10.1017/S0033291703001466.
4. Chang C-K, Hayes RD, Perera G, Broadbent MTM, Fernandes AC, Lee WE, et al. Life Expectancy at Birth for People with Serious Mental Illness and Other Major Disorders from a Secondary Mental Health Care Case Register in London. *PLoS One.* 2011; 6 (5): Available from: e19590. DOI: 10.1371/journal.pone.0019590.
5. Bachmann S. Epidemiology of Suicide and the Psychiatric Perspective. *Int J Environ Res Public Health.* 2018; 15(7): 1425. DOI: 10.3390/ijerph15071425.
6. Мазо Г. М., Касьянов Е. Д., Кибитов А. О. Мерцающая грань между депрессией и тревогой: клинические и генетические аспекты. *Социальная и клиническая психиатрия.* 2022; 32 (4): 50–8.
7. Незнанов Н. Г., Мартынихин И. А., Мосолов С. Н. Диагностика и терапия тревожных расстройств в Российской Федерации: результаты опроса врачей-психиатров. *Современная терапия психических расстройств.* 2017; 2: 2–13.
8. Мосолов С. Н. Современные биологические гипотезы рекуррентной депрессии (обзор). *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2012; 122 (11–22): 29–40.
9. Lee E-H, Han P-L. Reciprocal interactions across and within multiple levels of monoamine and cortico-limbic systems in stress-induced depression: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019; 101: 13–31. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.03.014.
10. Wang L, Yang P, Yang C, Yang D, Wu X, Cao T, et al. Disturbance of neurotransmitter metabolism in drug-naïve, first-episode major depressive disorder: a comparative study on adult and adolescent cohorts. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2022; 272 (7): 1283–96. DOI: 10.1007/s00406-022-01406-8.
11. Jeuring HW, D'Angremont E, Tol JMH, Risselada AJ, Sommer IEC, Oude Voshaar RC. The effectiveness of off-label dopamine stimulating agents in depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res.* 2023; 319: 115010. DOI: 10.1016/j.psychres.2022.115010.
12. Кичук И. В., Петрова Е. А., Митрофанов А. А., Соловьева Н. В., Вильянов В. Б. Изменения показателей электроэнцефалограммы и концентрации серотонина при депрессивных и тревожных расстройствах. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика.* 16AD; 8 (3): 34–8.
13. Соловьева Н. В., Звездин В. А., Урняева С. И., Мосова У. В., Соколов Р. В., Вильянов В. Б. Содержание биогенных моноаминов в сыворотке крови больных с эндогенными и экзогенными психическими расстройствами. *Академический журнал западной сибиряки.* 2013; 9 1 (44): 42–3.
14. Solmi M, Cortese S, Vita G, De Prisco M, Radua J, Dragioti E, et al. An umbrella review of candidate predictors of response, remission, recovery, and relapse across mental disorders. *Mol Psychiatry.* 2023; 28 (9): 3671–87. DOI: 10.1038/s41380-023-02298-3.
15. Li X, Fan Y, Xiao S, Peng S, Dong X, Zheng X, et al. Decreased platelet 5-hydroxytryptamin (5-HT) levels: a response to antidepressants. *J Affect Disord.* 2015; 187: 84–90. DOI: 10.1016/j.jad.2015.08.025.
16. Pech J, Forman J, Kessing LV, Knorr U. Poor evidence for putative abnormalities in cerebrospinal fluid neurotransmitters in patients with depression versus healthy non-psychiatric individuals: A systematic review and meta-analyses of 23 studies. *J Affect Disord.* 2018; 240: 6–16. DOI: 10.1016/j.jad.2018.07.031.
17. Esler M, Alvarenga M, Barton D, Jennings G, Kaye D, Guo L, et al. Measurement of Noradrenaline and Serotonin Metabolites With Internal Jugular Vein Sampling: An Indicator of Brain Monoamine Turnover in Depressive Illness and Panic Disorder. *Front Psychiatry.* 2022; 13. DOI: 10.3389/fpsy.2022.818012.
18. Pompili M, Lionetto L, Curto M, Forte A, Erbutto D, Montebovi F, et al. Tryptophan and Kynurenine Metabolites: Are They Related to Depression? *Neuropsychobiology.* 2019; 77(1): 23–8. DOI: 10.1159/000491604.
19. Zigmond AS, Snaith RP. The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand.* 1983; 67 (6): 361–70. DOI: 10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x.
20. Андриющенко А. В., Дробижев М. Ю., Добровольский А. В. Сравнительная оценка шкал CES-D, BDI и HADS в диагностике депрессий в общемедицинской практике. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова.* 2003; (5): 11–8.
21. Kalisch R, Russo SJ, Müller MB. Neurobiology and systems biology of stress resilience. *Physiol Rev.* 2024. DOI: 10.1152/physrev.00042.2023.
22. Безруков М. В., Шиллов Ю. Е., Шестакова Н. В., Ключник Т. П. Биологическая оценка выраженности депрессии: новый

- метод определения концентрации тромбоцитарного серотонина. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2014; 114 (8): 51–57.
23. Kibitov AA, Rakitko AS, Kasyanov ED, Rukavishnikov GV, Kozlova KA, Ilinsky VV, et al. Screening of Depressive Symptoms in a Russian General Population Sample: A Web-based Cross-sectional Study. *Clin Pract Epidemiol Ment Heal*. 2021; 17 (1): 205–11. DOI: 10.2174/1745017902117010205.
24. Морозова М. А., Потанин С. С., Бениашвили А. Г., Бурминский Д. С., Лепилкина Т. А., Рупчев Г. Е., и др. Валидация русскоязычной версии госпитальной шкалы тревоги и депрессии в общей популяции. *Профилактическая медицина*. 2023; 26 (4): 7–14.
- ### References
- WHO. World mental health report: Transforming mental health for all. 2022.
 - World Health Organization. The Global Burden of Disease. [cited 2024 Mar 24]. Available from: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html.
 - Lewinsohn PM, Shankman SA, Gau JM, Klein DN. The prevalence and co-morbidity of subthreshold psychiatric conditions. *Psychol Med*. 2004; 34 (4): 613–22. DOI: 10.1017/S0033291703001466.
 - Chang C-K, Hayes RD, Perera G, Broadbent MTM, Fernandes AC, Lee WE, et al. Life Expectancy at Birth for People with Serious Mental Illness and Other Major Disorders from a Secondary Mental Health Care Case Register in London. *PLoS One*. 2011; 6 (5): Available from: e19590. DOI: 10.1371/journal.pone.0019590.
 - Bachmann S. Epidemiology of Suicide and the Psychiatric Perspective. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15(7): 1425. DOI: 10.3390/ijerph15071425.
 - Mazo GM, Kasyanov ED, Kibitov AO. Mercayushchaya gran' mezhdru depressiej i trevojgoj: klinicheskie i geneticheskie aspekty. *Social'naya i klinicheskaya psichiatriya*. 2022; 32 (4): 50–8. Russian.
 - Neznanov NG, Martynihin IA, Mosolov SN. Diagnostika i terapiya trevozhnyh rasstrojstv v Rossijskoj Federacii: rezul'taty oprosa vrachej-psihiatrov. *Sovremennaya terapiya psihicheskikh rasstrojstv*. 2017; 2: 2–13. Russian.
 - Mosolov SN. Sovremennye biologicheskie gipotezy rekurrentnoj depressii (obzor). *Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S. S. Korsakova*. 2012; 122 (11–22): 29–40. Russian.
 - Lee E-H, Han P-L. Reciprocal interactions across and within multiple levels of monoamine and cortico-limbic systems in stress-induced depression: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019; 101: 13–31. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.03.014.
 - Wang L, Yang P, Yang C, Yang D, Wu X, Cao T, et al. Disturbance of neurotransmitter metabolism in drug-naïve, first-episode major depressive disorder: a comparative study on adult and adolescent cohorts. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2022; 272 (7): 1283–96. DOI: 10.1007/s00406-022-01406-8.
 - Jeuring HW, D'Angremont E, Tol JMH, Risselada AJ, Sommer IEC, Oude Voshaar RC. The effectiveness of off-label dopamine stimulating agents in depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res*. 2023; 319: 115010. DOI: 10.1016/j.psychres.2022.115010.
 - Kichuk IV, Petrova EA, Mitrofanov AA, Soloveva NV, Vilyanov VB. Izmeneniya pokazatelej elektroencefalogrammy i koncentracii serotonina pri depressivnyh i trevozhnyh rasstrojstvah. *Nevrologiya, nejropsichiatriya, psihosomatika*. 16AD; 8 (3): 34–8. Russian.
 - Soloveva NV, Zvezdin VA, Urnyaeva SI, Mosova UV, Sokolov RV, Vilyanov VB. Soderzhanie biogennyh monoaminov v syvorotke krovi bol'nyh s endogennymi i ekzogennymi psihicheskimi rasstrojstvami. *Akademicheskij zhurnal zapadnoj sibirj*. 2013; 9 1 (44): 42–3. Russian.
 - Solmi M, Cortese S, Vita G, De Prisco M, Radua J, Dragioti E, et al. An umbrella review of candidate predictors of response, remission, recovery, and relapse across mental disorders. *Mol Psychiatry*. 2023; 28 (9): 3671–87. DOI: 10.1038/s41380-023-02298-3.
 - Li X, Fan Y, Xiao S, Peng S, Dong X, Zheng X, et al. Decreased platelet 5-hydroxytryptamin (5-HT) levels: a response to antidepressants. *J Affect Disord*. 2015; 187: 84–90. DOI: 10.1016/j.jad.2015.08.025.
 - Pech J, Forman J, Kessing LV, Knorr U. Poor evidence for putative abnormalities in cerebrospinal fluid neurotransmitters in patients with depression versus healthy non-psychiatric individuals: A systematic review and meta-analyses of 23 studies. *J Affect Disord*. 2018; 240: 6–16. DOI: 10.1016/j.jad.2018.07.031.
 - Esler M, Alvarenga M, Barton D, Jennings G, Kaye D, Guo L, et al. Measurement of Noradrenaline and Serotonin Metabolites With Internal Jugular Vein Sampling: An Indicator of Brain Monoamine Turnover in Depressive Illness and Panic Disorder. *Front Psychiatry*. 2022; 13. DOI: 10.3389/fpsy.2022.818012.
 - Pompili M, Lionetto L, Curto M, Forte A, Erbutto D, Montebovi F, et al. Tryptophan and Kynurenine Metabolites: Are They Related to Depression? *Neuropsychobiology*. 2019; 77(1): 23–8. DOI: 10.1159/000491604.
 - Zigmond AS, Snaith RP. The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983; 67 (6): 361–70. DOI: 10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x.
 - Andryushchenko A. V., Drobizhev M. YU., Dobrovolskij A. V. Sravnitel'naya ocenka shkal CES-D, BDI i HADS v diagnostike depressij v obshchemedicinskoj praktike. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S. S. Korsakova*. 2003; (5): 11–8.
 - Kalisch R, Russo SJ, Müller MB. Neurobiology and systems biology of stress resilience. *Physiol Rev*. 2024. DOI: 10.1152/physrev.00042.2023.
 - Bezrukov MV, Shilov YuE, Shestakova NV, Klyushnik TP. Biologicheskaya ocenka vyrazhennosti depressii: novyj metod opredeleniya koncentracii tromboticarnogo serotonina. *Zhurnal nevrologii i psichiatrii im. S. S. Korsakova*. 2014; 114 (8): 51–57. Russian.
 - Kibitov AA, Rakitko AS, Kasyanov ED, Rukavishnikov GV, Kozlova KA, Ilinsky VV, et al. Screening of Depressive Symptoms in a Russian General Population Sample: A Web-based Cross-sectional Study. *Clin Pract Epidemiol Ment Heal*. 2021; 17 (1): 205–11. DOI: 10.2174/1745017902117010205.
 - Morozova MA, Potanin SS, Beniashvili AG, Burminskij DS, Lepilkina TA, Rupchev GE, i dr. Validaciya russkojazychnoj versii hospital'noj shkaly trevogi i depresii v obshchej populyacii. *Profilakticheskaya medicina*. 2023; 26 (4): 7–14.

РЕКОНСОЛИДАЦИЯ РАННИХ ВОСПОМИНАНИЙ В ПЕРЕЖИВАНИЯХ ТРАВМАТИЧЕСКОГО ОПЫТА УЧАСТИЯ В БОЕВЫХ ДЕЙСТВИЯХ

Е. А. Петраш¹✉, Н. Ю. Юнина-Пакулова¹, С. А. Курьшина¹, А. С. Карпенко², А. А. Кузнецова³

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

² Московский государственный институт международных отношений МИД Российской Федерации, Москва, Россия

³ Курский государственный медицинский университет Минздрава России, Курск, Россия

Память во всем многообразии видов и процессов, обеспечивающих ее функционирование, обладает психотерапевтическим ресурсом, который реализуется при работе с проявлениями посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). Одним из них являются навязчивые повторяющиеся воспоминания с травматическим содержанием. Цель данного исследования — изучить реконсолидацию ранних воспоминаний в переживаниях травматического опыта участия в боевых действиях. Общий объем выборки составил 62 человека (мужчины в возрасте 21–46 лет). В экспериментальную группу вошли 31 респондент с опытом участия в боевых действиях в статусе ветерана боевых действий (средний срок участия составил 1 год 5 месяцев). Контрольная группа состояла из 31 респондента без опыта участия в боевых действиях. Использовали Краткую шкалу оценки психического статуса (MMSE), набор функциональных нейропсихологических проб («10 слов» А. Р. Лурия, методику «Пиктограммы» А. Р. Лурия, методику «Трудно-вербализуемые фигуры» Т. В. Ахутиной, «Тест на воспроизведение ритмов» А. Р. Лурия), анализ стенограмм аудиозаписей ранних воспоминаний. Достоверно установлено, что раннее воспоминание положительной, отрицательной или нейтральной модальности, обусловленное влиянием опыта участия в боевых действиях, изменяется через механизм реконсолидации, что проявляется в лингвистических и семантических параметрах. Лингво-семантическая структура ранних воспоминаний ветеранов боевых действий характеризуется событийно-действенной моделью, с преобладанием глаголов и наречий. Семантическое ядро ранних воспоминаний ветеранов боевых действий чаще окрашено негативно, несмотря на общую амбивалентную или положительную модальность.

Ключевые слова: ранние воспоминания, автобиографическая память, опыт участия в боевых действиях, реконсолидация

Вклад авторов: все авторы внесли равнозначный вклад в планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ, интерпретацию данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России (протокол № 13 от 23 ноября 2023 г.), проведено в соответствии с требованиями Основ законодательства «Об охране здоровья граждан»; все участники подписали информированное согласие на обследование.

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

Статья получена: 25.10.2025 **Статья принята к печати:** 22.11.2025 **Опубликована онлайн:** 11.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.069

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/>).

RECONSOLIDATION OF EARLY MEMORIES IN RELIVING THE TRAUMATIC COMBAT EXPERIENCE

Petrash EA¹✉, Uynina-Pakulova NYu¹, Kuryishina SA¹, Karpenko AS², Kuznetsova AA³

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Moscow State Institute of International Relations of the Ministry of Foreign Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Kursk State Medical University of the Russian Ministry of Health, Kursk, Russia

Memory in all the variety of the types and processes ensuring its functioning has a psychotherapeutic resource that is realized when working with manifestations of post-traumatic stress disorder (PTSD). One of these is obsessive repetitive memories with traumatic content. The study aimed to look into reconsolidation of early memories in reliving the traumatic experience of participation in combat. The total sample size was 62 individuals (males aged 21–46 years). The experimental group included 31 respondents with combat experience having the status of war veterans (the average period of participation was 1 year and 5 months). The control group consisted of 31 respondents with no combat experience. The Mini-Mental State Examination (MMSE) scale, set of functional neuropsychological tests ("10 Words" by A.R. Luria, "Pictograms" method by A.R. Luria, "Difficult-to-Verbalize Figures" by T.V. Akhutina, "Rhythm Reproduction Test" by A.R. Luria), analysis of the transcripts of audio recordings of early memories were used. It has been reliably found that the early memory of a positive, negative or neutral modality resulting from the influence of combat experience is changed through the reconsolidation mechanism, which is reflected in the linguistic and semantic parameters. The linguistic and semantic structure of the combat veterans' early memories is characterized by the event-based model, with a predominance of verbs and adverbs. The semantic core of the combat veterans' early memories is more often negatively colored, despite the general ambivalent or positive modality.

Keywords: early memories, autobiographical memory, combat experience, reconsolidation

Author contribution: all authors contributed to study planning, literature review, data acquisition, analysis, and interpretation equally.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 13 dated 23 November 2023), and conducted in accordance with the requirements of Fundamentals of legislation "On Protection of Public Health"; all subjects submitted the informed consent to assessment.

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

Received: 25.10.2025 **Accepted:** 22.11.2025 **Published online:** 11.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.069

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/>).

Память социально обусловлена по своей природе и участвует в организации индивидуального опыта субъекта, способствует повышению продуктивности его деятельности с учетом социокультурных факторов ее выполнения (в частности, за счет улучшения запоминания той или иной лично значимой для конкретного индивида информации) [1]. Память, изучаемая во всем многообразии ее видов, а также процессов, обеспечивающих ее функционирование, обладает психотерапевтическим ресурсом, который реализуется в том числе при работе с проявлениями посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), одним из которых являются навязчивые повторяющиеся воспоминания с травматическим содержанием.

Изучение ранних воспоминаний как неотъемлемого компонента автобиографической памяти привлекает значительное внимание в рамках психологических исследований. Фокус исследовательского интереса сосредоточен преимущественно на феноменологических особенностях. Исследований лингвистической и семантической структуры ранних воспоминаний ветеранов боевых действий в научно-исследовательском пространстве представлено крайне мало, о чем свидетельствует результат проведенного библиометрического анализа. В период с 2014 по 2024 г. отмечается практически полное отсутствие научных работ, напрямую посвященных изучению ранних воспоминаний именно этой категории респондентов, что подчеркивает потенциальную значимость исследований данного направления. Обнаруженные публикации, связанные с общими аспектами изучения ранних воспоминаний (17 публикаций в eLibrary и 181 статья в Scopus), указывают на растущий интерес к теме в международном исследовательском пространстве и на необходимость более глубокого изучения феномена ранних воспоминаний у конкретных групп респондентов.

Выявленное противоречие между высоким научным интересом к феномену ранних воспоминаний в целом и отсутствием целенаправленных исследований, посвященных ветеранам боевых действий, обосновывает актуальность представляемого исследования.

Методологическими основаниями исследования были следующие: понятие автобиографической памяти В. В. Нурковой, рассматриваемой также в рамках представляемого культурно-исторического подхода [2]; положения теории функциональных систем П. К. Анохина [3], рассматривающего память в качестве одного из ведущих компонентов афферентного синтеза; нейрофизиологические механизмы мнестических процессов, описанные в работах К. В. Анохина [4].

Схема концептуальной модели представлена на рис. 1.

Автобиографическая память, являясь частью мнестической системы, детерминирует смысловую организацию лично соотнесенного опыта, субъектная принадлежность которого обеспечивается целостностью системы автобиографических воспоминаний (представляющих собой следы памяти) [2]. Ранние воспоминания и травматический опыт являются консолидированным содержанием автобиографической памяти, упорядоченным в определенной хронологии: консолидация раннего опыта хронологически предшествует консолидации травматического опыта. На нейрофизиологическом уровне, в процессе консолидации происходит формирование нейронных цепочек через изменения синаптической активности между нейронами, составляющими эту цепочку. Формируется система доступа для извлечения необходимой информации в конкретный момент времени, а также для реконсолидации следов памяти после их извлечения [4]. В процессе извлечения следов памяти происходит их активная реконструкция

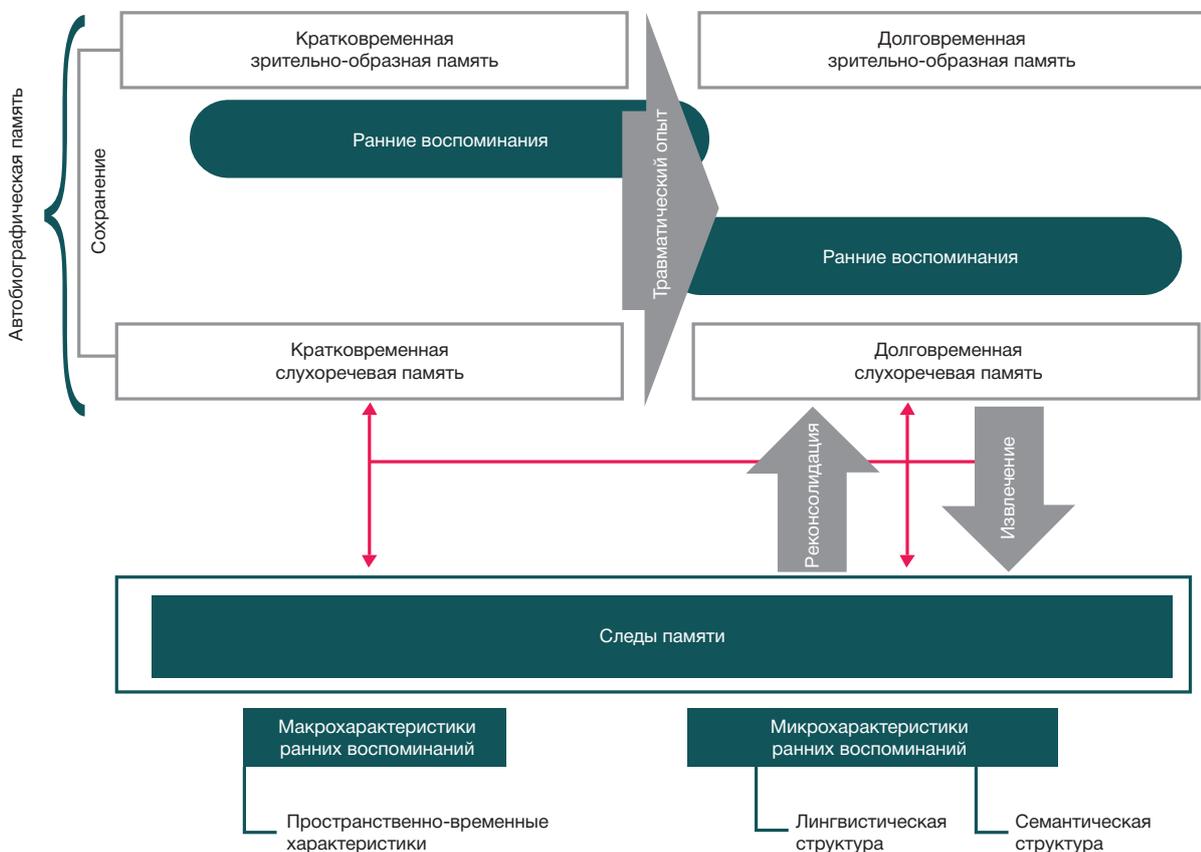


Рис. 1. Схема концептуальной модели исследования реконсолидации ранних воспоминаний в переживаниях травматического опыта участия в боевых действиях

(сопровождая рекатегоризацией) — замена старого следа памяти новым содержанием [5–7].

Каждое воспоминание (след памяти) в своей структуре имеет семантическую составляющую — сенсорно-перцептивное ядро, которое остается условно неизменным по своему содержанию. Вокруг семантического ядра находится эмоциональная оболочка, которая характеризует модальность конкретного воспоминания.

Все следы памяти, ранее сформированные и сохраненные, проходят через аффективное содержание травматических воспоминаний (опыта) и меняют свою модальность.

В качестве раннего воспоминания нами понимался след памяти, представляемый в форме вербального описания события, происшедшего с респондентом в детстве с указанием возраста, в котором описываемое событие происходило. Каждое раннее воспоминание имеет макрохарактеристики (пространство и время воспоминания, длительность, размерность, присутствие других людей и модальность). Модальность раннего воспоминания определяется эмоциональной окраской семантического ядра и ее соответствием общей эмоциональности воспоминания (отрицательные, положительные, амбивалентные и нейтральные). Микрохарактеристики имеют лингвосемантическую структуру (лингвистическая структура — части речи: глагол, существительное, местоимение, прилагательное, наречие, аффективные элементы и прочие части речи; семантическая структура — семантическое ядро воспоминания, его модальность; вторичные параметры воспоминания).

Именно мнестические процессы, являясь неотъемлемой частью афферентного синтеза в работе любой функциональной системы, обеспечивают анализ, синтез и сопоставление афферентных сигналов и далее на их основе последующую разработку определенных стратегий поведения в тех или иных ситуациях, с учетом прошлого опыта и его реструктуризации в изменяющихся условиях среды [3].

Опыт участия в боевых действиях, являющийся травматическим и характеризующийся наличием спонтанно возникающих повторяющихся травматических воспоминаний, проявлениями психомоторного возбуждения, эмоционально-когнитивными изменениями, а также симптомами избегания (представляющими собой проявления ПТСР), «встраиваясь» в систему автобиографической памяти, приводит к трансформации ранних воспоминаний.

В зарубежной научной литературе отражено активное изучение процесса реконсолидации именно травматических воспоминаний, в то время как трансформация ранних детских воспоминаний остается менее изученной областью, освещаемой, как правило, в теоретических работах исследователей, придерживающихся психоаналитической парадигмы [8, 9].

Нуркова В. В., описывая ранние детские воспоминания, произвольно трансформируемые личностью, указывает на то, что они выступают основой формирования ее личностной идентичности и жизненного сценария [10]. Следовательно, представляются возможными целенаправленное изменение дезадаптивного жизненного сценария личности и совладание с ее травматическим опытом с помощью реконсолидации ранних детских воспоминаний, которые играют ключевую роль в структуре и содержании ее идентичности, предпочитаемых паттернов восприятия и оценивания социальной действительности [11].

В условиях переживания травматического опыта участия в боевых действиях происходит трансформация ранних воспоминаний (и в макро- и в микрохарактеристиках) как на этапе извлечения, так и на этапе последующей реконсолидации. Симптомы навязчивого повторения (в том числе навязчивых, внезапно возникающих, повторяющихся травматических воспоминаний), симптомы избегания, происходящие в когнитивно-эмоциональной сфере негативные изменения, а также симптомы психомоторного возбуждения (описанные Н. В. Тарабриной как проявления ПТСР) приводят к изменениям лингвосемантической структуры ранних воспоминаний, влияя на их модальность, упрощая структуру и «встраивая» в них элементы навязчивых травматических воспоминаний.

Применение целенаправленной лингво-семантической реконструкции ранних воспоминаний ветеранов боевых действий в процессе их реконсолидации позволит обеспечить реорганизацию целостного индивидуального опыта субъекта, в том числе его травматических воспоминаний.

Целью данного исследования было изучить реконсолидацию ранних воспоминаний в переживаниях травматического опыта участия в боевых действиях.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Общий объем исследовательской выборки составил 62 человека в возрасте 21–46 лет. Все испытуемые — мужчины. Критерии включения в исследование: молодой и средний возраст (18–59 лет по классификации ВОЗ); отсутствие тяжелых соматических заболеваний в стадии декомпенсации; отсутствие психических нарушений. По критерию опыта участия в боевых действиях были сформированы исследовательские группы. В экспериментальную группу (ЭГ) были включены 31 респондент с опытом участия в боевых действиях в статусе ветерана боевых действий, находящегося на стационарном лечении в отделении реабилитации последствий минно-взрывных и огнестрельных ранений (средний возраст составил $32,2 \pm 0,17$ года). В экспериментальной группе контролировали срок участия респондентов в боевых действиях, продолжительность участия варьировалась от 4 дней до 2 лет 7 месяцев, средний срок участия составил 1 год 5 месяцев, при этом разброс значений — 2 года 7 месяцев. В контрольную группу (КГ) вошел 31 респондент без опыта участия в боевых действиях (средний возраст составил $26,1 \pm 0,43$ лет). В обеих группах испытуемых контролировали возраст ранних воспоминаний, задавали условия по длительности и размерности воспоминания (в количестве предложений). Первичные результаты исследования особенностей лингвосемантической структуры ранних воспоминаний ветеранов боевых действий оформляли в персональной анкете с процедурой кодирования.

Организация исследования включала в себя три последовательных этапа. Первым этапом осуществляли оценку когнитивного статуса респондентов с использованием Краткой шкалы оценки психического статуса (MMSE) [12]. Кроме того, осуществляли оценку уровня выраженности проявлений ПТСР для установления наличия психотравмирующего опыта и его последствий с использованием Миссисипской шкалы для оценки посттравматических реакций (Mississippi Scale — MS, Keane et al., в адаптации Н. В. Тарабриной) — военного варианта для респондентов, имеющих опыт участия в



Рис. 2. Усредненные профили кривых запоминания 10 слов у ветеранов боевых действий

боевых действиях, и гражданского для респондентов, не имеющих опыта участия в боевых действиях. В экспериментальную группу вошли респонденты с опытом участия в боевых действиях с высокими показателями проявлений ПТСР ($95,4 \pm 4,27$ баллов). В контрольную группу вошли респонденты с отсутствием опыта участия в боевых действиях и низкими показателями проявлений ПТСР ($72,4 \pm 4,27$ баллов).

На втором этапе решали задачу оценки мнестических функций ветеранов боевых действий. На данном этапе исследования в качестве методов использовали набор следующих функциональных нейропсихологических проб: «10 слов» для диагностики объема непосредственной кратковременной и долговременной слухоречевой памяти (А. Р. Лурия) [13]; методику «Пиктограммы» для диагностики опосредованной кратковременной и долговременной слухоречевой памяти (А. Р. Лурия) [13]; методику «Трудно-вербализуемые фигуры» для исследования точности, объема, прочности следов зрительно-пространственной памяти (Т. В. Ахутина) [14]; «Тест на воспроизведение ритмов» для оценки способности к восприятию и воспроизведению ритмических паттернов, что важно для диагностики нарушений слухового гнозиса и памяти (А. Р. Лурия) [14].

Задачей третьего этапа было оценить макро- и микрохарактеристики ранних воспоминаний ветеранов боевых действий. В качестве методов исследования на данном этапе выступали клиническая беседа (с аудиофиксацией) и лингвосемантический анализ представленных ранних воспоминаний. Участникам исследования предъявляли следующую инструкцию: «Сейчас я попрошу вас вспомнить самое раннее воспоминание, как только вспомните, расскажите мне его довольно подробно, не менее трех предложений, укажите ваш возраст в данном воспоминании». Оценку макро- и микрохарактеристик ранних воспоминаний ветеранов боевых действий осуществляли на основании стенограмм аудиозаписи, в которых фиксировались макрохарактеристики — пространство и время воспоминания, длительность, размерность, присутствие других людей и модальность; и микрохарактеристики, представляемые через описание лингвосемантической структуры ранних воспоминаний.

Количественную обработку полученных результатов осуществляли с использованием следующих методов: методов описательной (среднее значение, среднее квадратичное отклонение, частотный анализ, мода, медиана, разброс) и сравнительной статистики (U -критерий значимых различий Манна-Уитни, угловое преобразование Фишера, $p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам оценки когнитивного статуса с использованием шкалы MMSE, у 54,8% респондентов

психический статус без когнитивных нарушений (28–30 баллов), тогда как у 45,2% были зафиксированы легкие когнитивные нарушения (24–27 баллов). Низкий уровень выраженности когнитивных нарушений (менее 24 баллов) не выявлен. Следует отметить, что все респонденты, у которых были выявлены легкие когнитивные расстройства, в анкетных данных указывали перенесенные контузии, полученные в боевых действиях. При оценке значимости различий показателей когнитивного статуса респондентов экспериментальной и контрольной групп, достоверно установлено отсутствие статистически значимых различий ($p = 0,172$).

Выявлен высокий уровень непосредственного слухоречевого запоминания у ветеранов боевых действий: воспроизведено 9–10 слов к пятой попытке, 8–10 слов при отсроченном воспроизведении у 21 респондента (67,7%). У 6 респондентов (19,3%) зафиксирован средний уровень (6–8 слов к пятой пробе и 5–7 слов при отсроченном воспроизведении); у 4 человек (12,9 %) результаты имеют нестабильный профиль. На основании полученных данных были построены усредненные профили кривых запоминания, характеризующие динамику заучивания (рис. 2).

Таким образом, у ветеранов боевых действий наблюдается плавный рост между попытками, особенно выраженный между первой и третьей пробами (прирост более 2,7 слов); невысокая вариативность на пятой попытке (стандартное отклонение 0,86) говорит об устойчивости результатов у большинства испытуемых; вариативность возрастает при отсроченном воспроизведении (стандартное отклонение $\approx 1,5$), что может свидетельствовать о различиях в стратегиях кодирования в долговременной памяти.

При исследовании показателя опосредованного запоминания ветеранов боевых действий с применением методики «Пиктограмма» был выявлен высокий уровень у 32,3% респондентов (они воспроизвели 10–11 словосочетаний), средний — у 38,7% (воспроизвели 7–9 слов), и уровень ниже среднего — 25,8% ветеранов боевых действий, которые верно воспроизвели лишь 5–6 словосочетаний. Низкий уровень был зафиксирован у 3,2%.

Данные по методике «Пиктограммы» могут быть сопоставлены с результатами непосредственного запоминания в пробе «10 слов». В норме ожидается, что пиктограмма (смысловое опосредование) должна обеспечивать лучшее запоминание, чем механическое воспроизведение. Однако полученные данные указывают на нарушение или недостаточную реализацию этой стратегии. У 54,8% испытуемых объем непосредственной памяти оказался выше, чем опосредованной. Это противоречит теоретическому ожиданию и может говорить о когнитивной ригидности в переходе к абстрактному мышлению или о более высокой мотивации воспроизводить

Таблица 1. Показатели сравнительного анализа показателей типа локализации ранних воспоминаний в экспериментальной и контрольной группах

Группы	Дом	Конкретный город	Детский сад	Сельская местность	Локализация не выявлена	Суммы
	Доля испытуемых в группах					
ЭГ	3,20%	6,50%	6,50%	3,20%	67,70%	100%
КГ	9,70%	19,40%	3,20%	3,20%	48,4%	100%
φ*эмп	1,075	1,559	0,614	0	1,551	<1,64

конкретный материал у ветеранов боевых действий, что как раз отражает специфичность их рода деятельности, т. е. действовать по определенной команде. У 32,3% участников уровни опосредованной и непосредственной памяти совпали. Гипотеза о преимущественном воспроизведении с помощью опосредованного запоминания подтвердилась только у 12,9% респондентов.

По результатам анализа пробы темпо-ритмического запоминания по слуховому образу без зрительной опоры высокий уровень выполнения (5 верных серий из 5) отмечен только у 5,2%, средний (3–4 серии) — у 38,5%, низкий (0–1 серия) — у 56,3% респондентов. Среди типичных ошибок наблюдались лишние удары, которые могут свидетельствовать о функциональной недостаточности теменно-височных отделов мозга; сокращение, замедление ритмов указывает на возможную дисфункцию заднезрительных структур. Это позволяет говорить о слабой сформированности слухомоторной координации у ветеранов боевых действий.

По результатам анализа методики «Трудновербализуемые фигуры» (оценка зрительно-пространственной памяти) были установлены проявления высокого уровня запоминания у 37,4% респондентов, среднего — у 56,8% ветеранов боевых действий и только у 5,8% — уровень ниже среднего. Зрительно-пространственная память с привлечением неречевых материалов оказалась достаточно продуктивной.

В результате оценки макрохарактеристик ранних воспоминаний в экспериментальной и контрольной группах статистически значимые различия по показателю типа локализации не выявлены (табл. 1).

Пространственная локализация дифференцировалась в локациях «детский сад / сельская местность / конкретный город / у бабушки / дом / подъезд / пригород / поле». В свою очередь пространственная локализация у респондентов без опыта участия в боевых действиях дифференцировалась по месторасположению: дом / конкретный город / поликлиника / водохранилище / станция пригородного ж/д транспорта (село) / двор / база отдыха / детский сад / дача. А также в обеих группах выявлены те, у кого пространственная локализация не идентифицирована.

Наибольший процент как в ЭГ (68%), так и в КГ (49%), составляют воспоминания, где место действия не было явно установлено. Помимо этого, были выявлены общие конкретно-идентифицированные локализации, среди которых респонденты КГ чаще указывали «конкретный город» (20% против 7% в ЭГ) и «дом» (10% против 3%). В ЭГ чаще упоминается локация «детский сад» и «конкретный город» в равном процентном соотношении (по 7%). Остальные локации представлены эпизодически (по 3%), что указывает на их индивидуально-ограниченную роль в структуре ранних автобиографических воспоминаний.

При анализе показателя «время» ранних воспоминаний, т. е. возраста в ранних воспоминаниях, у респондентов с опытом участия в боевых действиях выявлен разброс от 2 до 22 лет, среднее значение = $7 \pm 0,4$. У респондентов без

опыта участия в боевых действиях разброс от 1 до 13 лет, среднее значение = $5 \pm 0,4$. Долевое различие по возрасту в ранних воспоминаниях показывает, что у респондентов без опыта участия в боевых действиях большая часть воспоминаний концентрируется в возрасте 4–6 лет: 23% воспоминаний приходится на 6 лет, 19% — на 5 лет, 16% — на 4 года. У респондентов, имеющих опыт участия в боевых действиях, пик воспоминаний наблюдается примерно в том же возрасте, что и у КГ, в возрасте 5 (19%) и 6 лет (16%). Было выявлено и различие: у ветеранов боевых действий наблюдается широкий возрастной разброс в воспоминаниях, включая подростковый возраст и период ранней взрослости (рис. 3).

Для ветеранов боевых действий характерны более поздние воспоминания, нежели для участников без опыта участия в боевых действиях. Пик воспоминаний в обеих группах приходится на возраст 4–6 лет, что соответствует общим закономерностям формирования автобиографической памяти. Однако для ЭГ (ветеранов боевых действий) характерна большая возрастная вариативность воспоминаний — от 2 до 22 лет, в отличие от КГ (1–13 лет), а среднее значение выше (7 лет против 5 лет). Эта тенденция указывает на то, что ветераны вовлекают в зону «раннего» опыта более поздние по хронологии, но значимые по содержанию эпизоды, включая подростковый и ранний взрослый периоды. Вероятно, такие воспоминания обладают высокой аффективной насыщенностью или ролевой значимостью, что способствует их интеграции в автобиографическое ядро памяти, несмотря на выход за пределы типичного возрастного диапазона ранних воспоминаний.

По показателю «длительность» ранних воспоминаний, а именно расстояние между актуальным возрастом и возрастом в раннем воспоминании, у респондентов с опытом участия в боевых действиях значения следующие: разброс от 2 до 40 лет, среднее значение — $25 \pm 0,7$. У респондентов без опыта участия в боевых действиях разброс от 8 до 38 лет, среднее значение — $19 \pm 0,6$. Анализ долевого распределения воспоминаний по расстоянию между актуальным возрастом и возрастом в раннем воспоминании показал выраженный пик в интервале 17–21 год в обеих группах, что соответствует эффекту «пика автобиографических воспоминаний», описанному В. В. Нурковой. Согласно этому эффекту, именно события, произошедшие в позднем подростковом и раннем взрослом возрасте, имеют повышенную вероятность сохранения в долговременной памяти за счет их эмоциональной насыщенности, социальной значимости и связи с формированием идентичности [18]. У ветеранов боевых действий наблюдается более растянутое распределение воспоминаний, в том числе отдаленных по возрастному интервалу — от 30 до 40 лет с равномерным распределением по 3–6% (рис. 3).

Для показателя «размерность воспоминания» были установлены следующие значения: у ветеранов боевых действий разброс от 3 до 25 предложений, среднее —

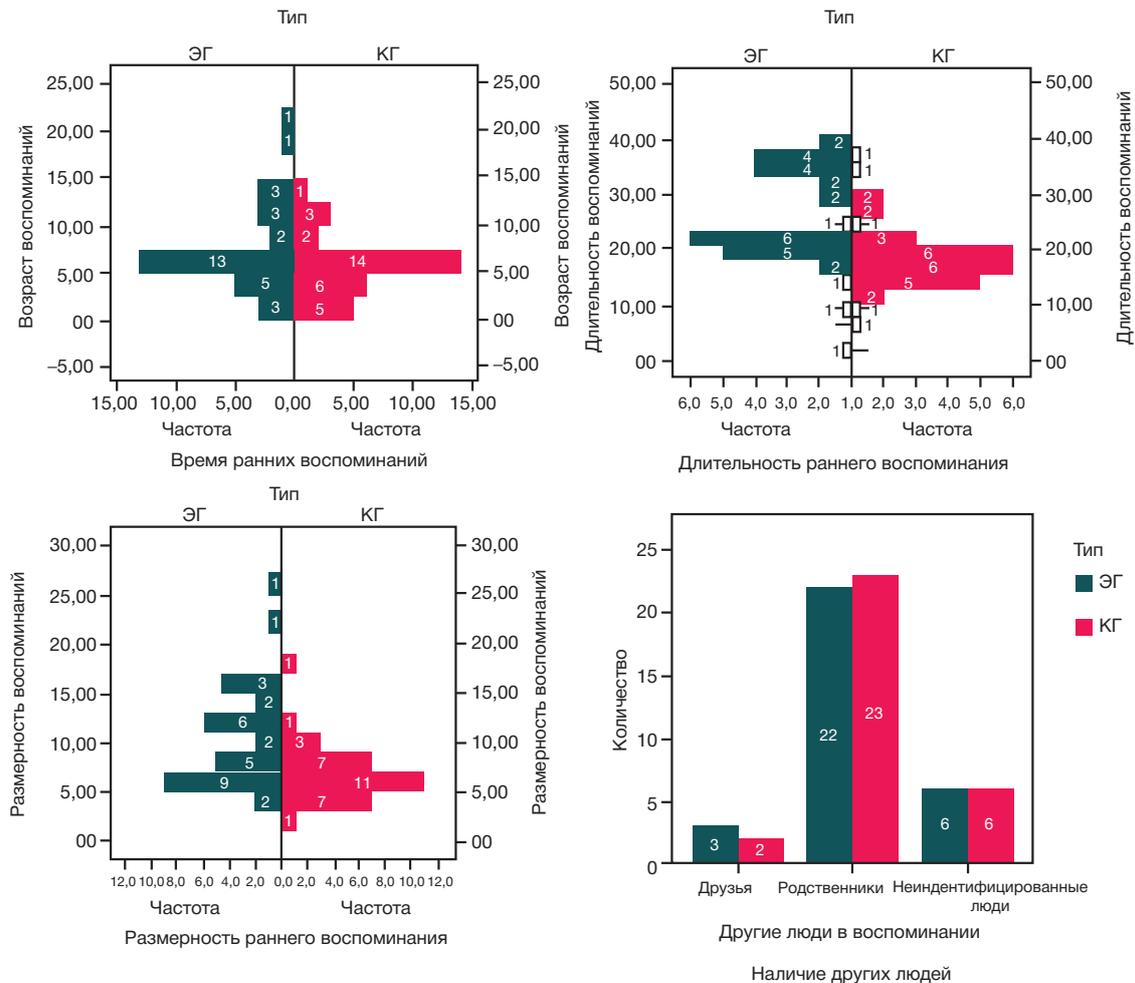


Рис. 3. Гистограмма частот распределения по показателю «время» и «длительность» ранних воспоминаний в экспериментальной и контрольной группах

9 ± 0,6. У респондентов без опыта участия в боевых действиях разброс от 2 до 17 предложений, среднее = 6 ± 0,4. Как в экспериментальной, так и в контрольной группе доминируют воспоминания объемом в 5–6 предложений (по 16–19%). Однако в КГ уже после 8 предложений доля резко снижается, тогда как у ветеранов боевых действий (ЭГ) наблюдается вторая волна более развернутых воспоминаний — на уровне 11 (16%) и 15 предложений (10%), а также фиксируются случаи максимально подробных описаний (до 25 предложений), отсутствующие в КГ (рис. 3). Развернутую форму ранних воспоминаний у ЭГ можно интерпретировать не только как высокую степень когнитивной переработки и смыслообразования, но и попытку переработки потенциально травматического опыта.

По показателю «наличие других людей» в ранних воспоминаниях результаты в обеих группах соответствуют друг другу. В ранних воспоминаниях у 100% респондентов присутствуют другие люди, варьируется только количество от 1 до 2 у ЭГ, от 1 до 3 у КГ. У ветеранов боевых действий преобладают родственники — 70%, затем неидентифицированные люди — 22% и лишь 8% процентов составляют друзья. У респондентов без опыта участия в боевых действиях так же преобладают родственники — 73%, потом неидентифицированные люди — 21% и 6% — друзья (рис. 3). Центральное место в ранних воспоминаниях как ветеранов боевых действий, так и респондентов без опыта участия в боевых действиях занимают близкие родственники (70 и 73% соответственно). Это подчеркивает важную роль семьи в

эмоциональном становлении человека и в формировании автобиографической памяти. Друзья встречаются в воспоминаниях значительно реже, а в каждом пятом случае упоминаются люди, чья идентичность не была обозначена. Такое распределение позволяет говорить о том, что именно семейные отношения становятся фундаментом для хранения и воспроизведения значимых событий детства.

Для оценки значимости различий в макрохарактеристиках ранних воспоминаний между ветеранами боевых действий и людьми без такого опыта был проведен сравнительный анализ полученных количественных данных с использованием непараметрического *U*-критерия Манна-Уитни (табл. 2).

В ходе сравнительного анализа количественных макрохарактеристик ранних воспоминаний были выявлены значимые различия размерности и возраста в воспоминании ($p < 0.01$) в экспериментальной и контрольной группах. У ветеранов боевых действий фиксируется вторая волна удлиненных воспоминаний, что можно рассматривать как механизм посттравматической переработки и адаптации через повествование. В КГ при отсутствии опыта участия в боевых действиях размерность раннего воспоминания резко снижается после 8 предложений.

При оценке модальности ранних воспоминаний в ЭГ чаще встречаются амбивалентные и положительные воспоминания и реже — нейтральные и отрицательные. У респондентов, не имеющих опыта участия в боевых действиях, преобладают ранние воспоминания, нейтральные по своей модальности (рис. 4).

Таблица 2. Результаты сравнительного анализа количественных макрохарактеристик ранних воспоминаний в экспериментальной и контрольной группах

Параметры	Ветераны боевых действий		Контрольная группа		U-критерий Манна-Уитни	Уровень статистической значимости
	Мода	Медиана	Мода	Медиана		
Длительность	21	22	17	19	405	0,284
Размерность	6	8	6	6	266,5	0,003**
Возраст в воспоминании	5	6	6	5	281,5	0,005**

Примечание: ** — значимость на уровне 0,01.

Полученные результаты указывают на то, что опыт участия в боевых действиях трансформирует ранние воспоминания в процессе их реконсолидации в направлении эмоциональной многозначности или смещения акцента в сторону положительной модальности. В то время как при отсутствии опыта участия в боевых действиях преобладают эмоционально нейтральные по модальности ранние воспоминания.

Микрохарактеристики описывают лингвистическую и семантическую структуру ранних воспоминаний.

Анализ долевого содержания различных частей речи в стенограммах, характеризующих лингвистическую структуру ранних воспоминаний у ветеранов боевых действий и у респондентов без боевого опыта, позволяет выделить ряд содержательных и когнитивно-языковых различий, соотносимых с функциональными характеристиками речевых единиц.

Ветераны боевых действий демонстрируют более высокую долю глагольных форм (в среднем 21,35% против 18,03% в КГ), что указывает на насыщенность их высказываний событийным содержанием, стремление структурировать воспоминание как последовательность действий, а не описаний, что отражает специфику боевого опыта с фиксацией происходящих событий и играет защитную когнитивную роль [16; 17]. Показатели употребления существительных являются сопоставимыми в обеих группах (20,16 % — ЭГ; 21,06 % — КГ), что подтверждает универсальную номинативную функцию данной части речи — представление объектов, лиц, явлений и абстракций, лежащих в основе когнитивной категоризации опыта [18]. Местоимения, обеспечивающие связность и референцию, встречаются чаще у респондентов с отсутствием опыта участия в боевых действиях — 16,87% (15,77% в группе ветеранов боевых действий). Это указывает на большую степень субъективной вовлеченности в воспоминание у представителей КГ, а также на ориентацию на внутреннюю перспективу рассказа [19]. У ветеранов боевых действий, напротив, наблюдается тенденция к дистанцированию от раннего опыта, проявляющаяся в снижении использования лично-маркированных единиц. Снижение доли атрибутивных и оценочных характеристик в высказываниях ветеранов боевых действий (4,55% в сравнении с 6,58% в КГ) может свидетельствовать о сниженной потребности в детализации, а также о специфике воспоминаний, в которых преобладают действия и обстоятельства, а не оценочные суждения [20; 21]. Различия в долевого представлении наречий (выше в группе ветеранов боевых действий — 11,61% в сравнении с 9,93% в КГ) указывают на значимость пространственно-временных параметров и субъективных оценок интенсивности происходящего ветеранами боевых действий [22]. Показатели значимости различий параметров лингвистической структуры ранних воспоминаний представлены в табл. 3.

Таким образом, выявленные различия в составе речевых единиц позволяют говорить о наличии двух когнитивно-дискурсивных моделей репрезентации ранних воспоминаний: событийно-действенной модели в группе ветеранов боевых действий (характеризующейся опорой на глагольные формы и наречия, отражающие динамику и обстоятельства действия, при минимуме оценочной лексики) и описательно-рефлексивной модели (которая базируется на существительных, местоимениях и прилагательных, создающих субъективно окрашенную и эмоционально детализированную картину прошлого опыта модель) для респондентов с отсутствием боевого опыта.

Оценка модальности семантического ядра ранних воспоминаний ветеранов боевых действий указывает на фиксацию в памяти события с преобладанием негативной эмоциональной оболочки семантического ядра. У респондентов с отсутствием травматического опыта преобладают воспоминания с положительной модальностью семантического ядра. Данные особенности семантической структуры отражают качественные характеристики воздействия жизненного контекста на отбор и закрепление ключевых смыслов. Эмоциональный вектор семантического ядра воспоминаний можно рассматривать как отражение не только индивидуального восприятия, но и условий формирования автобиографической памяти.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Смещение вектора эмоциональной модальности ранних воспоминаний участников боевых действий обусловлено стремлением к поддержанию внутренней устойчивости и целостности опыта: под воздействием негативно окрашенных навязчиво повторяющихся травматических

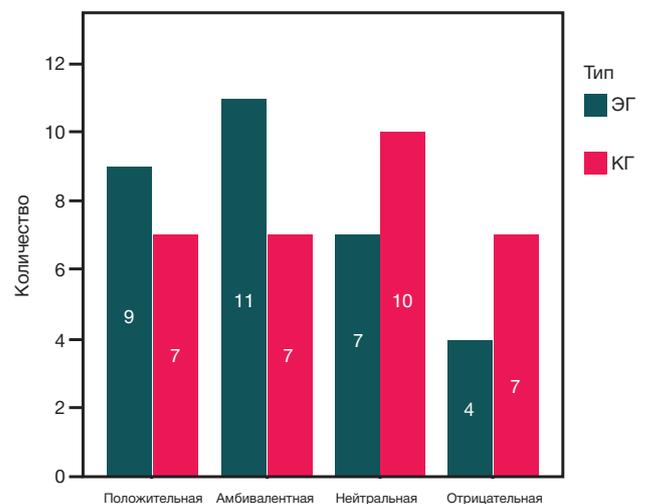


Рис. 4. Гистограмма частот распределения модальностей ранних воспоминаний в экспериментальной и контрольной группах

Таблица 3. Показатели значимости различий параметров лингвистической структуры ранних воспоминаний в экспериментальной и контрольной группах

	ЭГ		КГ		U-критерий Манна-Уитни	Уровень статистической значимости
	Мода	Медиана	Мода	Медиана		
Существительное	9	16	19	18	563	0,244
Местоимение	13	13	8	15	575	0,182
Глагол	12	20	10	15	307,5	0,015*
Прилагательное	2	3	2	5	647	0,018*
Наречие	7	9	6	8	366	0,105
Прочие части речи	12	21	18	24	531	0,475

Примечание: ** — значимость на уровне 0.01

воспоминаний в структуре автобиографической памяти изменяется направление вектора эмоциональной модальности в сторону положительной окраски ранних воспоминаний.

Показано, что после воздействия боевого травматического психологического стресса ветеранам боевых действий приходится фактически заново воссоздавать в условиях мирной жизни структуру своего субъективного жизненного пространства, в том числе и структуру самоотношения, самооценки и смысложизненных ориентаций. Именно поэтому в ключе реконсолидации раннего воспоминания данные респонденты прибегают к более подробному детальному изложению, пытаясь одновременно с этим восстановить собственный жизненный сценарий [23]. Обозначенный тезис также подтверждается и в нашем исследовании — через фиксацию более развернутой формы ранних воспоминаний у ветеранов боевых действий, указывающую на высокую степень когнитивной переработки и смыслообразования, потенциально обеспечивающую переработку травматического опыта. В содержании ранних воспоминаний респондентов, принявших участие в исследовании, при их воспроизведении не затрагивается сфера межличностных отношений, что является типичным для представителей мужского пола [24]. Показано, что высокая выраженность проявлений ПСТР приводит к нарушению хронологических границ событий собственной жизни, а также уменьшению количества

деталей следов памяти [25]. Согласно полученным нами результатам, именно развернутая форма вербального представления ранних воспоминаний у ветеранов боевых действий обеспечивает психотерапевтический ресурс когнитивной переработки травматических воспоминаний и восстановление хронологической целостности и упорядоченности содержания автобиографической памяти.

ВЫВОДЫ

В результате исследования достоверно установлено, что опыт участия в боевых действиях трансформирует ранние воспоминания через механизм реконсолидации, что проявляется в макро- и микрохарактеристиках. Развернутая форма вербального представления ранних воспоминаний у ветеранов боевых действий указывает на переработку личного опыта, в том числе и травматического, где повествовательная детализация выступает в качестве средства осмысления и интеграции жизненных событий в автобиографический контекст. Лингво-семантическая структура ранних воспоминаний ветеранов боевых действий характеризуется событийно-действенной моделью с преобладанием глаголов и наречий. Установлено, что семантическое ядро ранних воспоминаний ветеранов боевых действий чаще окрашено негативно, несмотря на общую амбивалентную или положительную модальность раннего воспоминания в целом.

Литература

1. Леонтьев А. Н. Развитие памяти. Экспериментальное исследование высших психологических функций. Ленинград: Учпедгиз, 1931; 280 с.
2. Нуркова В. В. Автобиографическая память как проблема психологического исследования. Вестник МГУ. Серия 14. Психология. 1996; 1: 58–59.
3. Анохин П. К. Узловые вопросы теории функциональной системы. М., 1980; 200 с.
4. Анохин К. В. Мозг и память: биология следов прошедшего времени. Вестник Российской академии наук. 2010; 80 (5–6): 455–61.
5. Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva J, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*. 2004; 24 (20): 4787–95.
6. Анохин К. В., Судаков К. В. Системная организация поведения: новизна как ведущий фактор экспрессии ранних генов в мозге при обучении. Успехи физиологических наук. 1993; 24: 53–70.
7. Kindt M, A. van Emmerik. New avenues for treating emotional memory disorders: towards a reconsolidation intervention for posttraumatic stress disorder. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. 2016; 6 (4): 283–95.
8. Нуркова В. В., Масолова Г. Ю. Характеристики воспоминаний о детстве и психологический облик взрослого. *Психологическая наука и образование*. 2009; 4: 1–16.
9. Gray RM, Budden-Potts D, Schwall RJ, Bourke FF. An open-label, randomized controlled trial of the reconsolidation of traumatic memories protocol (RTM) in military women. *Psychological Trauma: Theory, Research Practice, and Policy*. 2021; 13 (6): 641–58.
10. Нуркова В. В., Василенко Д. А. Формирование вариативного репертуара самоопределяющих воспоминаний как средство развития самоидентичности. Вестник Российского государственного гуманитарного университета. Серия «Психологические науки». 2013; 18 (119): 11–30.
11. Нуркова В. В., Михайлова О. И., Назлоян Г. М. Автопортрет как средство саморегуляции личности. *Журнал практического психолога*. 2005; 1: 100–19.
12. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*. 1975; 12 (3): 189–98.
13. Рубинштейн С. Я. Экспериментальные методики патопсихологии.

- М.: ЭКСМО-Пресс, 1999; 448 с.
14. Цветкова Л. С. Методика нейропсихологической диагностики детей. М.: Педагогическое общество России, 2002; 96 с.
 15. Нуркова В. В. Анализ феноменологии автобиографической памяти с позиций культурно-исторического подхода. *Культурно-историческая психология*. 2008; 4 (1): 17–26.
 16. Михайлина О. А. Роль глаголов в коммуникативной организации текста. *Вопросы филологии*. 2014; 1 (47): 330–2.
 17. Плотникова А. М. Когнитивное моделирование лексического значения глагола (на материале глаголов социальных действий и отношений). *Известия Российского государственного педагогического университета имени А. И. Герцена*. 2008; 11 (71): 73–80.
 18. Кручинкина Н. Д. Лексико-семантический и функционально-семантический потенциал существительного. *Научный результат. Вопросы теоретической и прикладной лингвистики*. 2017; 3 (3): 22–31.
 19. Синько Л. А. Местоимение в синтаксической системе: основные функции. *Языкознание*. 2008; 80–88.
 20. Копкова Е. В. К онтологии грамматики имени прилагательного: атрибутивная и предикативная функции. *Филология*. 2020; 196–9.
 21. Малыгина М. В. Текстовые функции прилагательных и наречий. *Вестник Псковского государственного педагогического университета. Серия: Социально-гуманитарные и психолого-педагогические науки*. 2011; 15: 96–100.
 22. Агалиева А. Наречие: структура, функции и роль в русском языке. *Ceteris Paribus*. 2024; 10: 87–89.
 23. Шамардина М. В., Ральникова И. А., Орлова О. А. Методы и приемы психологической помощи участникам боевых действий. *Алтайский государственный университет*. Барнаул: АлтГУ, 2023.
 24. Ситнянская Э. А. Гендерная специфика ранних воспоминаний у лиц молодого возраста. *Психологические исследования*. 2023; 16 (92).
 25. Pitts BL, Eisenberg ML, Bailey HR, Zacks JM. PTSD is associated with impaired event processing and memory for everyday events. *Cogn Res Princ Implic*. 2022; 7 (1): 35.

References

1. Leontev AN. *Razvitie pamyati. Eksperimental'noe issledovanie vysshih psihologicheskikh funkcij*. Leningrad: Uchpedgiz, 1931; 280 s. Russian.
2. Nurkova VV. *Avtobiograficheskaya pamyat' kak problema psihologicheskogo issledovaniya*. *Vestnik MGU. Seriya 14. Psihologiya*. 1996; 1: 58–59. Russian.
3. Anohin PK. *Uzlovye voprosy teorii funkcional'noj sistemy*. M., 1980; 200 s. Russian.
4. Anohin KV. *Mozg i pamyat': biologiya sledov proshedshego vremeni*. *Vestnik Rossijskoj akademii nauk*. 2010; 80 (5–6): 455–61. Russian.
5. Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva J, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*. 2004; 24 (20): 4787–95.
6. Anohin KV, Sudakov KV. *Sistemnaya organizaciya povedeniya: novizna kak vedushchij faktor ekspressii rannih genov v mozge pri obuchenii*. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk*. 1993; 24: 53–70. Russian.
7. Kindt M, A. van Emmerik. New avenues for treating emotional memory disorders: towards a reconsolidation intervention for posttraumatic stress disorder. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. 2016; 6 (4): 283–95.
8. Nurkova VV, Masolova GYu. *Harakteristiki vospominanij o detstve i psihologicheskij oblik vzroslogo. Psihologicheskaya nauka i obrazovanie*. 2009; 4: 1–16. Russian.
9. Gray RM, Budden-Potts D, Schwall RJ, Bourke FF. An open-label, randomized controlled trial of the reconsolidation of traumatic memories protocol (RTM) in military women. *Psychological Trauma: Theory, Research Practice, and Policy*. 2021; 13 (6): 641–58.
10. Nurkova VV, Vasilenko DA. *Formirovanie variativnogo repertuara samoopredelyayushchih vospominanij kak sredstvo razvitiya samoidentichnosti*. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo gumanitarnogo universiteta. Seriya «Psihologicheskie nauki»*. 2013; 18 (119): 11–30. Russian.
11. Nurkova VV, Mihajlova OI, Nazloyan GM. *Avtoportret kak sredstvo samoreguljatsii lichnosti*. *ZHurnal prakticheskogo psihologa*. 2005; 1: 100–19. Russian.
12. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of psychiatric research*. 1975; 12 (3): 189–98.
13. Rubinshtejn SYa. *Eksperimental'nye metodiki patopsihologii*. M.: EKSMO-Press, 1999; 448 s. Russian.
14. Cvetkova LS. *Metodika nejropsihologicheskoy diagnostiki detej*. M.: Pedagogicheskoe obshchestvo Rossii, 2002; 96 s. Russian.
15. Nurkova VV. *Analiz fenomenologii avtobiograficheskoy pamyati s pozicij kul'turno-istoricheskogo podhoda. Kul'turno-istoricheskaya psihologiya*. 2008; 4 (1): 17–26. Russian.
16. Mihajlina OA. *Rol' glagolov v kommunikativnoj organizacii teksta. Voprosy filologii*. 2014; 1 (47): 330–2. Russian.
17. Plotnikova AM. *Kognitivnoe modelirovanie leksicheskogo znachenija glagola (na materiale glagolov social'nyh dejstvij i otnoshenij). Izvestiya Rossijskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta imeni A. I. Gercena*. 2008; 11 (71): 73–80. Russian.
18. Kruchinkina ND. *Leksiko-semanticheskij i funkcional'no-semanticheskij potencial sushchestvitel'nogo. Nauchnyj rezul'tat. Voprosy teoreticheskoy i prikladnoj lingvistiki*. 2017; 3 (3): 22–31.
19. Sin'ko LA. *Mestoimenie v sintaksicheskoy sisteme: osnovnye funkcii*. *Yazykoznanie*. 2008; 80–88. Russian.
20. Koptkova EV. *K ontologii grammatiki imeni prilagatel'nogo: atributivnaya i predikativnaya funkcii*. *Filologiya*. 2020; 196–9. Russian.
21. Maljgina MV. *Tekstovye funkcii prilagatel'nyh i narechij*. *Vestnik Pskovskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta. Seriya: Social'no-gumanitarnye i psihologo-pedagogicheskie nauki*. 2011; 15: 96–100. Russian.
22. Agaljeva A. *Narechie: struktura, funkcii i rol' v russkom yazyke. Ceteris Paribus*. 2024; 10: 87–89. Russian.
23. Shamardina MV, Ralnikova IA, Orlova OA. *Metody i priemny psihologicheskoy pomoshchi uchastnikam boevyh dejstvij*. *Altajskij gosudarstvennyj universitet*. Barnaul: AltGU, 2023. Russian.
24. Sitnyanskaya EA. *Gendernaya specifika rannih vospominanij u lic mladogo vozrasta. Psihologicheskie issledovaniya*. 2023; 16 (92). Russian.
25. Pitts BL, Eisenberg ML, Bailey HR, Zacks JM. PTSD is associated with impaired event processing and memory for everyday events. *Cogn Res Princ Implic*. 2022; 7 (1): 35.

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ОПУХОЛЕВЫЕ АЛЛОАНТИГЕНЫ В УСЛОВИЯХ СОКРАЩЕННОГО КЛОНАЛЬНОГО РАЗНООБРАЗИЯ Т-КЛЕТОК

М. С. Короткова, Н. А. Персиянцева, А. А. Калинина, Л. М. Хромых, Д. Б. Казанский ✉

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

Т-клеточный рецептор (ТКР), представляющий собой $\alpha\beta$ -гетеродимер, предназначен для распознавания пептидных антигенов в комплексе с собственными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). При этом значительная доля клонотипов Т-клеток обладает аллореактивностью, т. е. способностью взаимодействовать с различными аллельными вариантами МНС и ассоциированными с ними пептидами. В настоящее время нет четкой определенности, зависит ли эффективность аллогенного иммунного ответа от широты репертуара ТКР. В данной работе использовали мышей с трансгенной экспрессией β -цепи ТКР (ТКР β), что позволило экспериментально сузить разнообразие клонотипов Т-клеток. Цель работы — проанализировать развитие ответа ТКР β -трансгенных мышей на генетической основе CBA/Lac (H-2^k) на клетки лимфомы EL-4 (H-2K^d) *in vivo* для оценки влияния сужения репертуара на аллогенный иммунный ответ. Показано, что у трансгенных мышей развивается слабый иммунный ответ на трансплантационные антигены с формированием пула цитотоксических Т-клеток, в 1,5–1,7 раза сокращенного по сравнению с животными дикого типа. Вследствие этого отторжение аллогенной опухоли становится невозможным, и наступает гибель 100% животных. Полученные данные согласуются с результатами наших ранних исследований с использованием другой ТКР β -трансгенной модели и подтверждают, что снижение разнообразия репертуара ТКР ухудшает эффективность ответа на аллоантигены и создает условия для избегания опухолью иммунного ответа и ее прогрессирования в аллогенном реципиенте.

Ключевые слова: Т-клетка, Т-клеточный рецептор, аллогенный ответ, сокращение клонального разнообразия

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-15-00342-П (<https://rscf.ru/project/22-15-00342/>).

Вклад авторов: М. С. Короткова — проведение экспериментов, анализ результатов; Н. А. Персиянцева — проведение экспериментов, анализ результатов, редактирование; А. А. Калинина — планирование исследования, анализ и интерпретация результатов, анализ литературы, написание статьи, редактирование; Л. М. Хромых — редактирование; Д. Б. Казанский — планирование исследования, анализ и интерпретация результатов, анализ литературы, редактирование.

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

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

Статья получена: 06.10.2025 **Статья принята к печати:** 01.11.2025 **Опубликована онлайн:** 14.11.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.057

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/>).

FEATURES OF THE IMMUNE RESPONSE TO TUMOR ALLOANTIGENS IN THE CONTEXT OF DECREASED CLONAL DIVERSITY OF T CELLS

Korotkova MS, Persiyantseva NA, Kalinina AA, Khromykh LM, Kazansky DB ✉

Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

A T cell receptor (TCR), an $\alpha\beta$ heterodimer, recognizes peptide antigens presented by self molecules of the major histocompatibility complex (MHC). A significant number of T cell clonotypes are alloreactive: they can interact with various allelic variants of MHC and the associated peptides. Currently, it is unclear whether the effectiveness of the allogeneic immune response depends on the diversity of the TCR repertoire. Seeking to experimentally narrow the diversity of T cell clonotypes, we used mice with transgenic expression of the β -chain TCR (TCR β) in this work. We analyzed how the TCR β -transgenic mice on the CBA/Lac (H-2^k) background respond to EL-4 (H-2K^d) lymphoma cells *in vivo* with the aim to assess the effect of a narrower repertoire on the allogeneic immune response. The study has shown that transgenic mice develop a weak immune response to transplant antigens, and the formed pool of cytotoxic T cells is 1.5–1.7-fold smaller than that in wild-type animals. Consequently, the mice failed to reject the allogeneic tumor, leading to 100% mortality rate. The results of this work are consistent with the data from our earlier studies that employed another TCR β -transgenic model. They confirm that the decreased diversity of the TCR repertoire impairs the response to alloantigens, allowing the tumor to evade the immune response and progress in the allogeneic recipient.

Keywords: T-cell, T-cell receptor, allogeneic response, decreased clonal diversity

Funding: the study was financially supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-15-00342-П (<https://rscf.ru/project/22-15-00342/>).

Author contribution: Korotkova MS — experimental work, analysis of the results; Persiyantseva NA — experimental work, analysis of the results, article editing; Kalinina AA — study planning, analysis and interpretation of the results, analysis of the available literature, article authoring and editing; Khromykh LM — article editing; Kazansky DB — study planning, analysis and interpretation of the results, analysis of the available literature, article editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the N.N. Blokhin National Research Medical Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation (Minutes No. 3-П10.06.2022 of June 10, 2022) and conducted in strict accordance with the provisions of Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry B. Kazansky
Kashirskoe shosse, 24, str. 15, Moscow, 115478, Russia; kazansky1@yandex.ru

Received: 06.10.2025 **Accepted:** 01.11.2025 **Published online:** 14.11.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.057

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/>).

Т-клеточное звено адаптивного иммунитета характеризуется способностью специфически распознавать антигены посредством высокоспециализированного Т-клеточного рецептора (ТКР), представляющего собой $\alpha\beta$ -гетеродимер в доминирующем типе Т-клеток и имеющего уникальную структуру у каждого индивидуального клонотипа. В результате внутритимусного развития и селекции формируется периферический репертуар ТКР, способный эффективно взаимодействовать с собственными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), презентующими чужеродный пептид или пептид эндогенного мутантного белка [1]. При этом значительная часть, если не все клоны периферических Т-клеток, аллореактивны [2], т. е. могут реагировать на аллогенные молекулы МНС и ассоциированные с ними пептиды [3–5]. В ответ Т-клеточного репертуара реципиента на индивидуальный аллогенный трансплантат может быть вовлечено до 10% Т-клеток [6].

Аллореактивные Т-клетки — ключевые медиаторы трансплантационного иммунитета, которые опосредуют острое отторжение аллотрансплантата [7]. На сегодняшний день имеются противоречивые данные о том, определяет ли разнообразие репертуара ТКР интенсивность аллогенного ответа [8]. Так, в ряде работ показано, что исходное высокое разнообразие репертуара ТКР реципиента создает повышенный риск острого отторжения аллогенного трансплантата [9, 10]. Между тем было установлено, что в отторжение трансплантата вовлекается узкий олигоклональный репертуар [11–13].

Экспериментальные модели, предполагающие трансплантацию реципиенту опухоли с отличиями по одному трансплантационному антигену [14, 15], позволяют исследовать динамику и особенности развития аллогенного иммунного ответа *in vivo*. В результате прямого распознавания аллогенных молекул МНС I класса индуцируется интенсивный цитотоксический CD8⁺-иммунный ответ и происходит быстрое отторжение аллогенной опухоли с формированием иммунологической памяти [14–16]. Для подтверждения ранее полученных нами данных о зависимости эффективности аллогенного иммунного ответа от широты разнообразия репертуара ТКР [14] в настоящей работе использовали мышей с трансгенной экспрессией β -цепи ТКР (ТКР β) гибридомы 7, описанной ранее [17]. Трансгенез ТКР β дает возможность экспериментально сокращать разнообразие рецепторов Т-лимфоцитов [14, 18]: в силу правила аллельного исключения экспрессия трансгенной ТКР β блокирует перестройку генов и, как следствие, экспрессию собственных β -цепей в Т-клетках. В результате доминирующая часть репертуара представлена клонотипами с инвариантной β -цепью, и разнообразие обеспечивается только за счет эндогенных α -цепей в структуре рецептора.

Цель работы — используя ТКР β -трансгенную модель, проанализировать развитие иммунного ответа на опухолевые аллоантигены *in vivo* в условиях сокращенного клонального разнообразия Т-клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали самок мышей инбредных линий CBA/Lac (H-2^k) и C57BL/6 (H-2^b) (6–8 недель, 18–20 г) и трансгенных мышей 7В из разведения «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России. Трансгенные мыши 7В были получены, как описано ранее [18]. Исходно трансген был переведен на генетическую основу мышей

линии C57BL/6. В связи с ограниченным временем жизни полученных животных, создающим препятствия для их разведения, трансген был переведен на генетическую основу линии CBA/Lac и сохраняется в собственной коллекции лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина». Трансгенные мыши 7В характеризуются экспрессией β -цепи ТКР, специфичного к мутантной молекуле МНС I класса K^{bm3} и молекуле МНС II класса I-A^b [17]. Животных содержали при температуре 20–24 °C при 40% относительной влажности, 12-часовом световом режиме и свободном доступе к корму и воде. Трансгенным мышам 7В и контрольным животным (нетрансгенным сибсам, дикий тип) трансплантировали внутрибрюшинно клетки лимфомы EL-4 (H-2K^b) в дозе 1×10^6 клеток/мышь в 500 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) и оценивали продолжительность жизни мышей со сроком наблюдения более 30 дней. Кривые выживаемости Каплана–Мейера строили при помощи SRplot [19]. Часть животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации на 12-й день после трансплантации клеток EL-4 и извлекали клетки брюшной полости. Полученные образцы клеток лаважа анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

В работе использовали флуоресцентно меченые антитела (BioLegend, CША; BD Bioscience, CША; BD Horizon, CША): CD3 — APC-Cy7, CD8 — Percp-Cy5.5, CD44 — Pacific blue, CD62L — APC, Vb8.3 — PE, Kb — FITC. Пробы клеток ($0,5\text{--}1 \times 10^6$) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, CША) (10 мин при 4 °C) для предотвращения неспецифического связывания антител, затем окрашивали мечеными антителами (40 мин, 4 °C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Bioscience) в программе FACSDiva 6.0 (BD Bioscience). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A. Для окрашивания мертвых клеток использовали набор LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain (Invitrogen, CША). Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain и по показателям светорассеяния. Экспрессию поверхностных маркеров оценивали в популяции живых одиночных лейкоцитов. Относительное количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенную β -цепь ТКР, оценивали по окрашиванию анти-Vb8.3 антителами (семейство V β , к которому принадлежит трансгенная β -цепь 7В). Относительное количество опухолевых клеток EL-4 в брюшной полости экспериментальных животных определяли по экспрессии молекулы МНС I класса H-2K^b (Kb). Анализ популяций Т-лимфоцитов проводили после исключения Kb-позитивных клеток. Данные обрабатывали в программе Flow Jo 7.6 (TreeStar Inc., CША). Стратегия цитофлуориметрического анализа представлена на рис. 1.

Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента, дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Тьюки (post-hoc Tukey test). Предварительно осуществляли проверку нормальности распределения выборок с использованием теста Колмогорова–Смирнова для подтверждения корректности использования указанных статистических методов. Статистический анализ проводили с использованием онлайн-ресурса SRplot [19]. Различия признавали значимыми при $p \leq 0,05$.

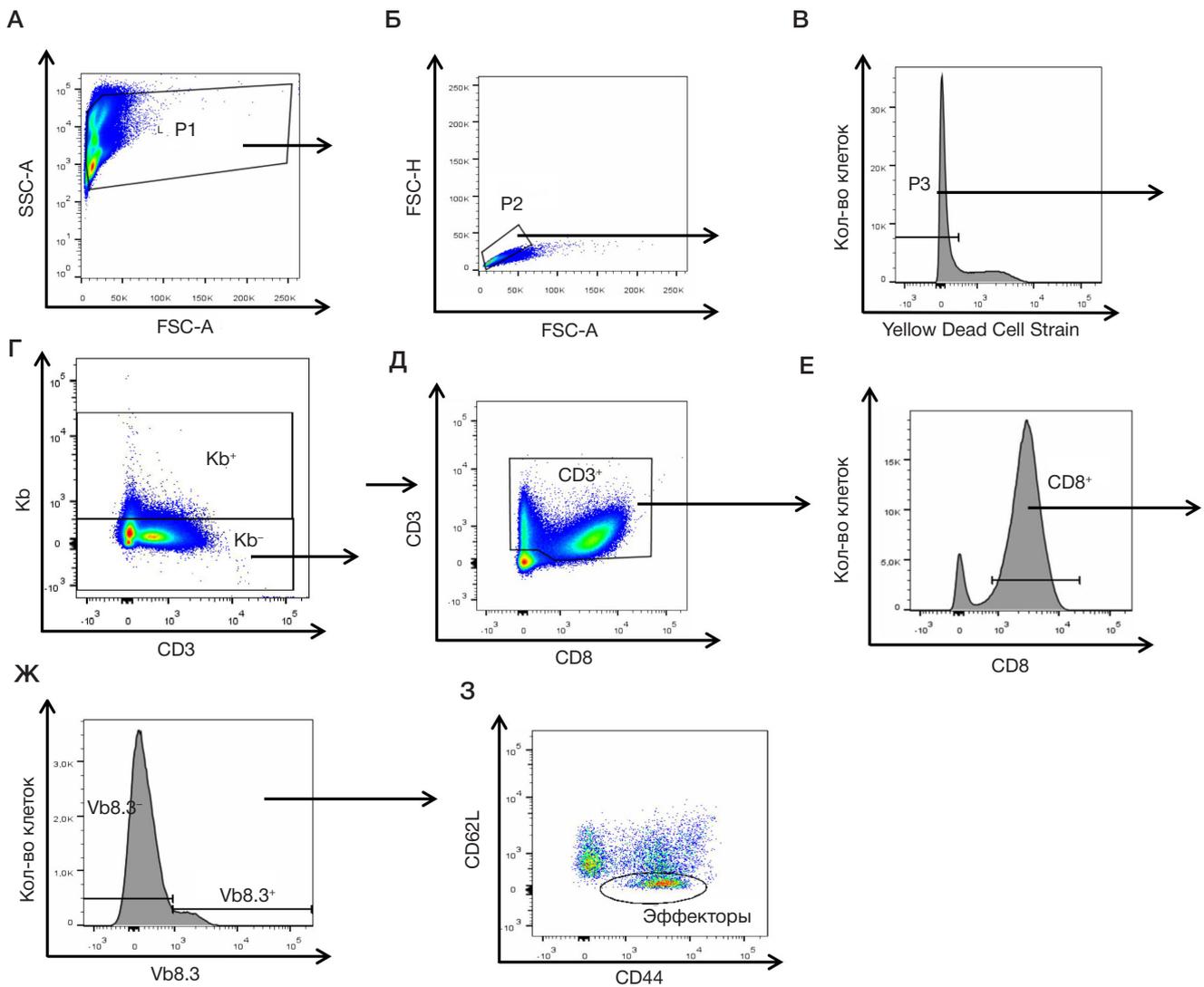


Рис. 1. Стратегия анализа клеток брюшной полости мышей методом проточной цитофлуориметрии. При анализе проводили последовательное выделение популяций: лейкоцитов по параметрам прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния (P1) (А); одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A (P2) (Б); живых клеток, негативных по окрашиванию Yellow Dead Cell Stain (P3) (В); клеток EL-4 и лейкоцитов реципиента по анализу ко-экспрессии маркеров K β и CD3: K β ⁺CD3⁺-клетки EL-4 (K β ⁺), K β ⁻CD3⁺-клетки реципиента (K β ⁻) (Г). Д. В популяции K β ⁻CD3⁺-клеток (K β ⁻) выделяли Т-клетки (CD3⁺) по ко-экспрессии CD3 и CD8 (CD3⁺CD8⁺-клетки). Е. В популяции CD3⁺-клеток выделяли цитотоксические CD8⁺ Т-клетки (CD8⁺). Ж. В популяции CD8⁺ Т-клеток выделяли клетки, экспрессирующие эндогенные β -цепи Т-клеточного рецептора (ТКР β) (V β 8.3⁻), и клетки с трансгенной ТКР β (V β 8.3⁺). З. Индивидуально для популяции V β 8.3⁻ и V β 8.3⁺ CD8⁺ Т-клеток анализировали ко-экспрессию маркеров CD44 и CD62L и определяли долю (%) эффекторов (CD62L⁺CD44⁺)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как было отмечено выше, трансгенез β -цепи ТКР существенно сокращает разнообразие репертуара рецепторов периферических Т-клеток. Для выяснения особенностей функционирования Т-клеточного иммунитета в условиях сниженного разнообразия клонотипов исследовали развитие иммунного ответа трансгенных мышей 7В (Н-2^к) на клетки аллогенной лимфомы EL-4 (Н-2К^б) *in vivo*. Т-лимфоциты по месту локализации опухолевых клеток (в брюшной полости) анализировали на 12-й день после трансплантации EL-4. В норме к этому дню наблюдается пик иммунного ответа цитотоксических Т-клеток на аллоантигены лимфомы EL-4 [14, 16].

В брюшной полости иммунизированных мышей 7В (TG⁺EL-4) было отмечено увеличение абсолютного количества клеток на два порядка по сравнению с интактными (неиммунизированными) трансгенными мышами (TG) и в 20 раз по сравнению с иммунизированными животными дикого типа (WT⁺EL-4) (рис. 2А). Лаваж иммунизированных 7В содержал более 90% клеток EL-4 (K β ⁺), тогда как у

контрольных мышей (WT⁺EL-4) на данном сроке аллогенная опухоль была практически полностью элиминирована, и доля K β ⁺-клеток составила всего 5% (рис. 2Б).

Мыши 7В оказались не способны отторгнуть аллогенную лимфому EL-4, и в среднем через 19 дней наступала гибель 100% трансгенных животных (рис. 3). Стоит при этом отметить, что у 7В наблюдалась более пролонгированная динамика гибели по сравнению с мышами C57BL/6, для которых EL-4 является сингенной и убивает животных за 10–12 дней (рис. 3). Это указывает на то, что у трансгенных мышей 7В ответ на аллогенную лимфому EL-4 проходит через, хоть и недостаточные эффективные, стадии элиминации и равновесия, предшествующие избеганию опухолевыми клетками иммунологического надзора.

Активный иммунный ответ мышей дикого типа на клетки EL-4 (WT⁺EL-4) сопровождался накоплением Т-клеток, относительное количество которых возросло в среднем в 4 раза (рис. 4А, Б), и увеличением доли цитотоксических CD8⁺-клеток в 5 раз по сравнению с интактным контролем (WT) (рис. 4В, Г). Данный эффект не наблюдался у иммунизированных трансгенных мышей

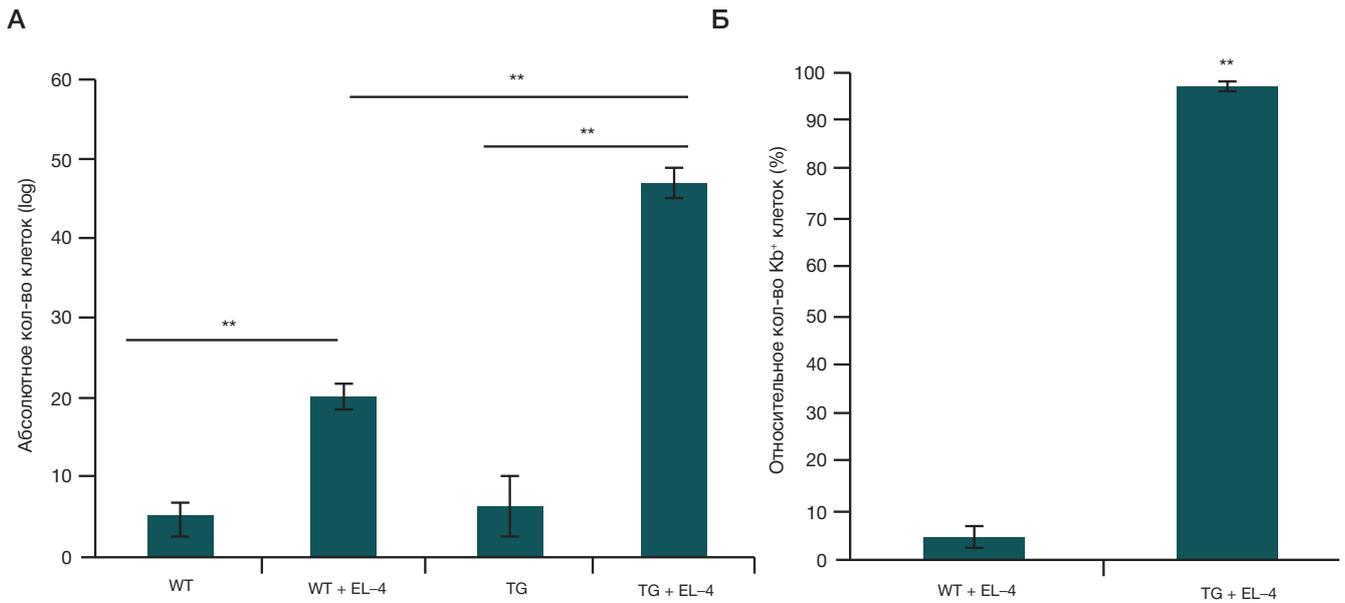


Рис. 2. Особенности развития аллогенной лимфомы EL-4 в трансгенных мышах 7В. Трансгенным мышам 7В (H-2^b) трансплантировали внутрибрюшинно клетки аллогенной лимфомы EL-4 (H-2K^b) (TG+EL-4). В качестве контроля использовали нетрансгенных сибсов (WT+EL-4). На 12 день после трансплантации EL-4 анализировали клетки брюшной полости методом проточной цитофлуориметрии. **А.** Абсолютное количество (log) клеток. **Б.** Относительное количество (%) опухолевых клеток EL-4 (Kb^a). ** — $p \leq 0,01$ (ANOVA, post-hoc-тест Тьюки). ** — $p \leq 0,01$ (непарный *t*-критерий Стьюдента). Представлены данные двух независимых экспериментов ($n = 4-6$)

(TG+EL-4), и относительное количество Т-лимфоцитов (рис. 4А, Б) и CD8⁺-Т-клеток (рис. 4В, Г) не было увеличено по сравнению с контрольной группой без иммунизации (TG). Однако стоит отметить, что соотношение CD8⁺-клеток, экспрессирующих трансгенную β -цепь ТКР (Vb8.3⁺) или эндогенные β -цепи ТКР (Vb8.3⁻), в брюшной полости иммунизированных 7В (TG+EL-4) составило примерно 1:1 по сравнению с 2:1 в группе контроля (TG) (рис. 4Д, Е), что указывает на вовлечение обеих субпопуляций цитотоксических Т-клеток в ответ на клетки EL-4.

В соответствии с этим у иммунизированных мышей 7В было выявлено увеличение доли эффекторных (CD44⁺CD62L⁻) CD8⁺ Т-клеток с трансгенной ТКР β в 1,8 раза (рис. 5А, Б) и эффекторных CD8⁺-клеток с эндогенными ТКР β в 1,5 раза (рис. 5В, Г) по сравнению с соответствующими субпопуляциями CD44⁺CD62L⁻ Т-клеток интактных трансгенных мышей (TG). Между тем, относительное количество Vb8.3⁺ и Vb8.3⁻ CD8⁺-эффекторов в брюшной полости иммунизированных трансгенных мышей (TG+EL-4) было в 1,5–1,7 раза ниже по сравнению с иммунизированными животными дикого типа (WT+EL-4) (50–56% против 84–86%) (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты настоящего исследования указывают на развитие слабого иммунного ответа *in vivo* на аллоантигены у трансгенных мышей 7В с формированием небольшого пула эффекторных цитотоксических Т-клеток, что согласуется с данными нашей ранней работы с использованием другой ТКР β -трансгенной модели [14].

В ряде работ было показано, что ТКР β -трансгенные животные сохраняют способность отвечать на различные антигены, в том числе аллогенные молекулы МНС [20, 21]. Это указывает на высокую пластичность репертуара ТКР, позволяющую компенсировать значительное сокращение разнообразия клонотипов, обусловленное экспрессией трансгенной β -цепи [20, 21]. Однако интенсивность иммунного ответа у ТКР β -трансгенных мышей снижена

по сравнению с животными дикого типа [14, 20, 21] из-за небольшой частоты отвечающих клонов Т-клеток [20, 22], и, как следствие, у таких животных отмечается замедленная динамика развития Т-клеточных ответов *in vivo* [21]. Важно при этом, что формирующийся цитотоксический CD8⁺-иммунный ответ ТКР β -трансгенных мышей на аллогенную молекулу МНС I класса (H-2K^b) оказывается недостаточным для отторжения аллогенной опухоли (рис. 4, рис. 5) [14]. Таким образом, ответ даже на сильный трансплантационный антиген становится малоэффективным вследствие сужения разнообразия репертуара ТКР.

В этом отношении распознавание антигенов аллогенной опухоли подчиняется тем же законам, что и распознавание опухолевых антигенов в комплексе с собственными молекулами МНС. Известно, что эффективность

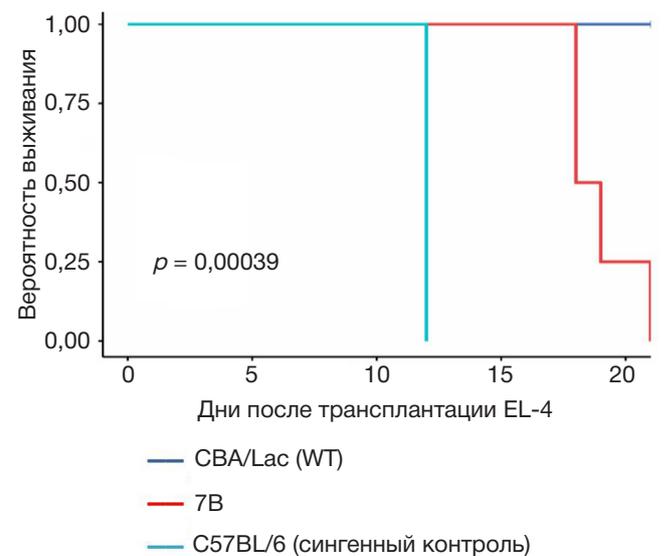


Рис. 3. Кривые выживаемости трансгенных мышей 7В после трансплантации лимфомы EL-4. В качестве контроля использовали мышей родительской линии CBA/Lac (WT) и мышей C57BL/6, для которых EL-4 является сингенной опухолью. Представлены данные одного репрезентативного эксперимента ($n = 4$)

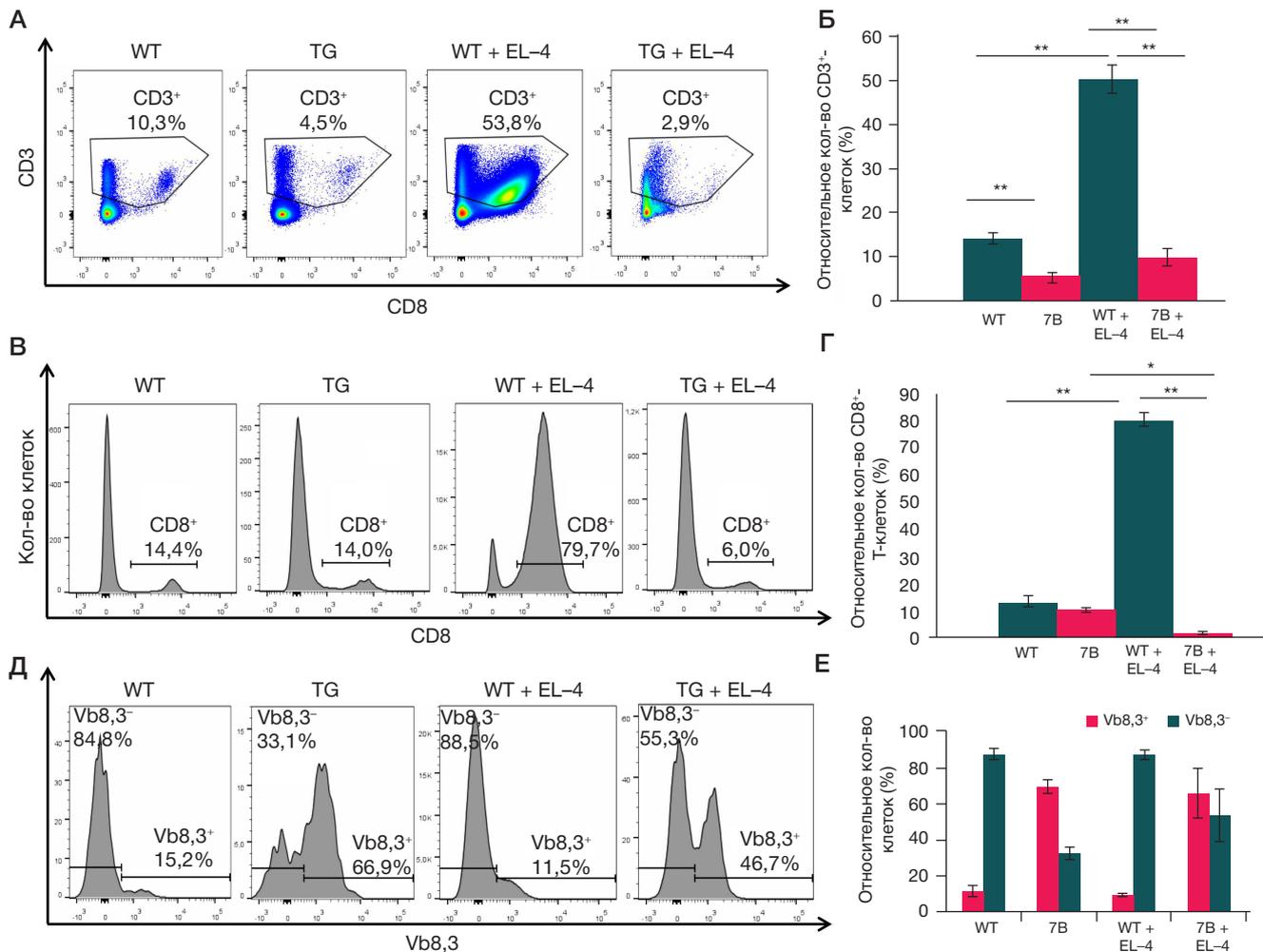


Рис. 4. Анализ иммунного ответа мышей 7B на аллогенную опухоль *in vivo*. Трансгенным мышам 7B (TG+EL-4) и нетрансгенным сибсам (WT+EL-4) трансплантировали внутрибрюшинно клетки аллогенной лимфомы EL-4. На 12 день после трансплантации EL-4 анализировали клетки брюшной полости методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контроля использовали интактных (неиммунизированных) животных родительской линии CBA/Lac (WT) и трансгенной линии 7B (TG). **А, Б.** Относительное количество (%) T-клеток (CD3⁺). **В, Г.** Относительное количество (%) цитотоксических CD8⁺ T-клеток. **Д, Е.** Относительное количество (%) CD8⁺ T-клеток с трансгенной β -цепью T-клеточного рецептора (ТКР β) (Vb8.3⁺) и CD8⁺ T-клеток с эндогенно реарранжированными ТКР β (Vb8.3⁻). **А, В, Д.** Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. **Б, Г, Е.** Представлены данные двух экспериментов как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4-6$). * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$, ANOVA, post-hoc-тест Тьюки

противоопухолевого ответа и, как следствие, устранения трансформированных клеток во многом определяется мутационной нагрузкой опухоли, т. е. ее иммуногенностью [23, 24], и клональным разнообразием T-клеток, способных распознать опухолевые неоантигены или опухоль-ассоциированные антигены [24, 25]. Было показано, что высокое разнообразие репертуара ТКР рециркулирующих T-клеток периферической крови служит благоприятным прогностическим фактором, например, при меланоме [26], немелкоклеточном раке легкого [27, 28], раке молочной железы [29], а низкое разнообразие ТКР опухоль-инфильтрирующих T-клеток ассоциировано с плохим прогнозом при раке желудка и некоторых других типах рака [30–32].

Естественные процессы старения иммунной системы, особенно инволюция тимуса и клональная экспансия клеток памяти на периферии, вызывают сокращение разнообразия репертуара ТКР T-лимфоцитов [33–35], что обуславливает большую предрасположенность пожилых людей к инфекциям и онкологии [33, 36]. Кроме того в экспериментальной модели было показано, что у мышей в возрасте 12 месяцев снижены ответы на аллоантигены также вследствие возраст-ассоциированного сужения репертуара клонотипов T-клеток [34, 37].

Полученные в данном исследовании результаты подтверждают установленную ранее [14] прямую зависимость эффективности иммунного ответа на опухолевые аллоантигены от широты репертуара зрелых T-лимфоцитов.

Выводы

В настоящей работе показано, что у трансгенных мышей 7B развивается иммунный ответ *in vivo*, недостаточно эффективный, чтобы элиминировать клетки аллогенной опухоли. Из-за экспрессии трансгенной β -цепи ТКР снижаются количество и частота клонотипов цитотоксических T-клеток, способных распознавать аллогенные молекулы МНС. При этом опухолевый процесс у трансгенных мышей 7B проходит через все стадии иммуноредактирования — от малоэффективных стадий элиминации и равновесия до избегания опухолевыми клетками иммунного ответа. Полученные данные согласуются с результатами наших ранних работ и подтверждают, что вследствие ограничения разнообразия репертуара ТКР не происходит отторжения аллогенной опухоли, а наблюдается ее прогрессирующее развитие. В этом случае развивающийся у аллогенного

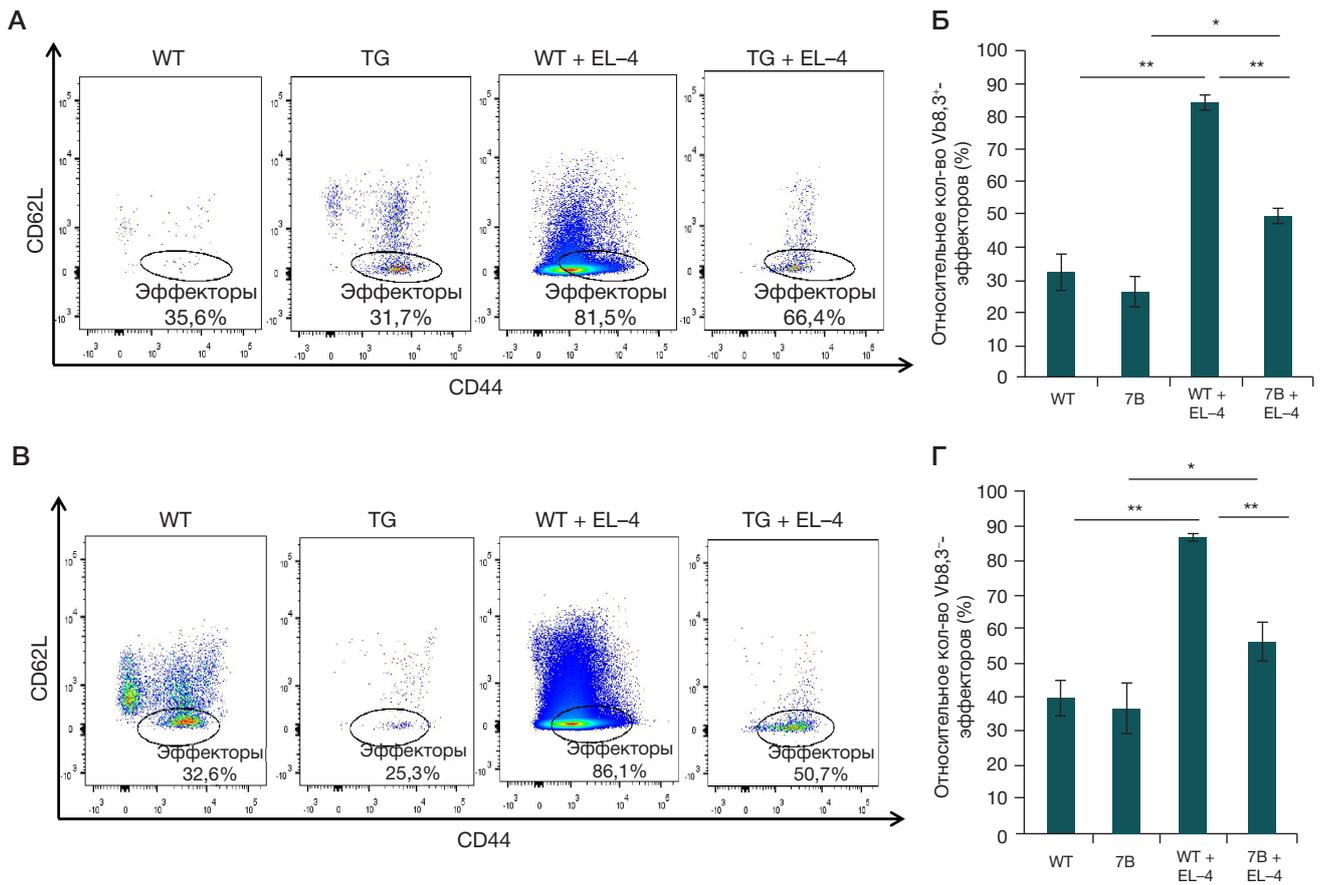


Рис. 5. Анализ пула цитотоксических эффекторных Т-клеток трансгенных мышей 7В в ответе на аллогенную лимфому EL-4 *in vivo*. Анализ эффекторных CD44⁺CD62L⁻ CD8⁺ Т-клеток в брюшной полости трансгенных мышей 7В (TG+EL-4) и нетрансгенных сибсов (WT+EL-4) на 12 день после трансплантации EL-4. В качестве контроля использовали интактных (неиммунизированных) животных родительской линии CBA/Lac (WT) и трансгенной линии 7В (TG). **А, Б.** Относительное количество (%) эффекторных Т-клеток с трансгенной ТКРβ (Vb8.3⁺). **В, Г.** Относительное количество (%) эффекторных Т-клеток с эндогенно реаранжированными ТКРβ (Vb8.3⁻). **А, В.** Представлены данные одного репрезентативного окрашивания. **Б, Г.** Представлены данные двух экспериментов как среднее ± стандартная ошибка среднего ($n = 4-6$). * — $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,01$, ANOVA, post-hoc-тест Тьюки

реципиента слабый иммунный ответ способствует селекции наименее иммуногенных злокачественных

клонов, являясь, таким образом, движущим фактором иммуноредактирования опухоли.

Литература

- Murphy K., Weaver C., Berg L. Janeway's Immunobiology. 10th ed. New York: W. W. Norton & Company, Inc, 2022.
- DeWolf S, Grinshpun B, Savage T, Lau SP, Obradovic A, Shonts B, et al. Quantifying size and diversity of the human T cell alloresponse. JCI Insight. 9; 3 (15): e121256.
- Tian G, Li M, Lv G. Analysis of T-Cell Receptor Repertoire in Transplantation: Fingerprint of T Cell-mediated Alloresponse. Front Immunol. 2022; 12: 778559.
- Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. Curr Opin Organ Transplant. 2016; 21 (1): 40–44.
- Kazansky DB. MHC restriction and allogeneic immune responses. J Immunotoxicol. 2008; 5 (4): 369–84.
- D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. Immunogenetics. 2012; 64 (2): 77–85.
- Duneton C, Winterberg PD, Ford ML. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation. Nat Rev Nephrol. 2022; 18 (10): 663–76.
- Link-Rachner CS, Eugster A, Rücker-Braun E, Heidenreich F, Oelschlägel U, Dahl A, et al. T-cell receptor- α repertoire of CD8⁺ T cells following allogeneic stem cell transplantation using next-generation sequencing. Haematologica. 2019; 104 (3): 622–31.
- Tian G, Song S, Zhi Y, Qiu W, Chen Y, Sun X, et al. Alloreactive T cells temporarily increased in the peripheral blood of patients before liver allograft rejection. Liver Transpl. 2024; 30 (12): 1250–63.
- Mendoza Rojas A, Verhoeven JGHP, de Kuiper R, Clahsen-van Groningen MC, Boer K, Hesselink DA, et al. Alloreactive T cells to Assess Acute Rejection Risk in Kidney Transplant Recipients. Transplant Direct. 2023; 9 (5): e1478.
- Kim JY, Lei Z, Maienschein-Cline M, Chlipala GE, Balamurugan A, McDiarmid SV, et al. Longitudinal Analysis of the T-cell Receptor Repertoire in Graft-infiltrating Lymphocytes Following Hand Transplantation. Transplantation. 2021; 105 (7): 1502–9.
- Obata F, Yoshida K, Ikeda Y, Ohkubo M, Saito T, Takeuchi Y, et al. Clonality analysis of T cells mediating acute and chronic rejection in kidney allografts. Transpl Immunol. 2004; 13 (3): 233–7.
- Zeng G, Huang Y, Huang Y, Lyu Z, Lesniak D, Randhawa P. Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. Am J Transplant. 2016; 16 (11): 3131–8.
- Silaeva YY, Grinenko TS, Vagida MS, Kalinina AA, Khromykh LM, et al. Immune selection of tumor cells in TCR β -chain transgenic mice. J Immunotoxicol. 2014; 11 (4): 393–9.
- Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogeneic

- response by CD8⁺ memory cells. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140 (5): 545–9.
16. Zamkova M, Kalinina A, Silaeva Y, Persiyantseva N, Bruter A, Deikin A, et al. Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR α transgenic mice and in vitro experiments. *Oncotarget*. 2019; 10: 4808–21.
 17. Побезинский Л. А., Побезинская Е. Л., Гриненко Т. С., Червонский А. В., Казанский Д. Б. Периферический пул Т-клеток CD8⁺ содержит лимфоциты с антигенспецифическими рецепторами, распознающими сингенные молекулы MHC класса II. *Онтогенез*. 2004; 35 (3): 183–9.
 18. Silaeva Y, Kalinina A, Vagida M, Khromykh LM, Deikin AV, Ermolkevich TG, et al. Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β -chain expression. *Biochemistry (Moscow)*. 2013; 78: 549–59.
 19. Tang D, Chen M, Huang X, Zhang G, Zeng L, Zhang G, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS ONE*. 2023; 18 (11): e0294236.
 20. Listman JA, Rimm J, Wang Y, Geller MC, Tang JC, Ho S, et al. Plasticity of the T cell receptor repertoire in TCR beta-chain transgenic mice. *Cell Immunol*. 1996; 167 (1): 44–55.
 21. Ewing C, Allan W, Daly K, Hou S, Cole GA, Doherty PC, et al. Virus-specific CD8⁺ T-cell responses in mice transgenic for a T-cell receptor beta chain selected at random. *J Virol*. 1994; 68 (5): 3065–70.
 22. Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol*. 2012; 88 (9): 4135–40.
 23. Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell*. 2021; 39 (2): 154–73.
 24. Aran A, Garrigós L, Curigliano G, Cortés J, Martí M. Evaluation of the TCR Repertoire as a Predictive and Prognostic Biomarker in Cancer: Diversity or Clonality? *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (7): 1771.
 25. Wilczyński JR, Nowak M. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors. In: Klink M., Szulc-Kielbik I, editors. *Interaction of Immune and Cancer Cells. Experientia Supplementum*, vol 113: Springer, 2022.
 26. Charles J, Mouret S, Challende I, Leccia MT, De Fraipont F, Perez S, et al. T-cell receptor diversity as a prognostic biomarker in melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2020; 33 (4): 612–24.
 27. Qian L, Zhaohui Z, Yaping X, Zhentian L, Zhentao L, Qiqi W, et al. Blood T cell diversity associated with the prognosis of advanced non-small cell lung carcinoma treated with first-line pemetrexed based chemotherapy. *Thorac Cancer*. 2021; 12 (7): 997–1005.
 28. Abed A, Beasley AB, Reid AL, Law N, Calapre L, Millward M, et al. Circulating pre-treatment T-cell receptor repertoire as a predictive biomarker in advanced or metastatic non-small-cell lung cancer patients treated with pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy. *ESMO Open*. 2023; 8 (6): 102066.
 29. Manuel M, Tredan O, Bachelot T, Clapisson G, Courtier A, Parmentier G, et al. Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2012; 1 (4): 432–40.
 30. Jia Q, Zhou J, Chen G, Shi Y, Yu H, Guan P, et al. Diversity index of mucosal resident T lymphocyte repertoire predicts clinical prognosis in gastric cancer. *Oncoimmunology*. 2015; 4 (4): e1001230.
 31. Jin YB, Luo W, Zhang GY, Lin KR, Cui JH, Chen XP, et al. TCR repertoire profiling of tumors, adjacent normal tissues, and peripheral blood predicts survival in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2018; 67 (11): 1719–30.
 32. Cui JH, Lin KR, Yuan SH, Jin YB, Chen XP, Su XK, Jet al. TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 2729.
 33. Fulop T, Larbi A, Pawelec G, Khalil A, Cohen AA, Hirokawa K, et al. Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023; 64 (2): 109–22.
 34. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014; 192 (6): 2689–98.
 35. Шевырев Д. В., Терещенко В. П., Козлов В. А. Гомеостатическая пролиферация: от нормы к патологии. *Российский иммунологический журнал*. 2018; 21 (2): 91–105.
 36. Montégut L, López-Otín C, Kroemer G. Aging and cancer. *Mol Cancer* 2024; 23 (1): 106.
 37. Kalinina AA, Ziganshin RK, Silaeva YY, Sharova NI, Nikonova MF, Persiyantseva NA, et al. Physiological and Functional Effects of Dominant Active TCR α Expression in Transgenic Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6527.

References

1. Murphy K., Weaver C., Berg L. *Janeway's Immunobiology*. 10th ed. New York: W. W. Norton & Company, Inc, 2022.
2. DeWolf S, Grinshpun B, Savage T, Lau SP, Obradovic A, Shonts B, et al. Quantifying size and diversity of the human T cell alloresponse. *JCI Insight*. 9; 3 (15): e121256.
3. Tian G, Li M, Lv G. Analysis of T-Cell Receptor Repertoire in Transplantation: Fingerprint of T Cell-mediated Alloresponse. *Front Immunol*. 2022; 12: 778559.
4. Lin CM, Gill RG. Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21 (1): 40–44.
5. Kazansky DB. MHC restriction and allogeneic immune responses. *J Immunotoxicol*. 2008; 5 (4): 369–84.
6. D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition. *Immunogenetics*. 2012; 64 (2): 77–85.
7. Duneton C, Winterberg PD, Ford ML. Activation and regulation of alloreactive T cell immunity in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2022; 18 (10): 663–76.
8. Link-Rachner CS, Eugster A, Rücker-Braun E, Heidenreich F, Oelschlägel U, Dahl A, et al. T-cell receptor- α repertoire of CD8⁺ T cells following allogeneic stem cell transplantation using next-generation sequencing. *Haematologica*. 2019; 104 (3): 622–31.
9. Tian G, Song S, Zhi Y, Qiu W, Chen Y, Sun X, et al. Alloreactive T cells temporarily increased in the peripheral blood of patients before liver allograft rejection. *Liver Transpl*. 2024; 30 (12): 1250–63.
10. Mendoza Rojas A, Verhoeven JGHP, de Kuiper R, Clahsen-van Groningen MC, Boer K, Hesselink DA, et al. Alloreactive T cells to Assess Acute Rejection Risk in Kidney Transplant Recipients. *Transplant Direct*. 2023; 9 (5): e1478.
11. Kim JY, Lei Z, Maienschein-Cline M, Chlipala GE, Balamurugan A, McDiarmid SV, et al. Longitudinal Analysis of the T-cell Receptor Repertoire in Graft-infiltrating Lymphocytes Following Hand Transplantation. *Transplantation*. 2021; 105 (7): 1502–9.
12. Obata F, Yoshida K, Ikeda Y, Ohkubo M, Saito T, Takeuchi Y, et al. Clonality analysis of T cells mediating acute and chronic rejection in kidney allografts. *Transpl Immunol*. 2004; 13 (3): 233–7.
13. Zeng G, Huang Y, Huang Y, Lyu Z, Lesniak D, Randhawa P. Antigen-Specificity of T Cell Infiltrates in Biopsies With T Cell-Mediated Rejection and BK Polyomavirus Viremia: Analysis by Next Generation Sequencing. *Am J Transplant*. 2016; 16 (11): 3131–8.
14. Silaeva YY, Grinenko TS, Vagida MS, Kalinina AA, Khromykh LM, et al. Immune selection of tumor cells in TCR β -chain transgenic mice. *J Immunotoxicol*. 2014; 11 (4): 393–9.
15. Grinenko TS, Pobezinskaya EL, Pobezinskii LA, Baturina IA, Zvezdova ES, Kazanskii DB. Suppression of primary allogeneic response by CD8⁺ memory cells. *Bull Exp Biol Med* 2005; 140 (5): 545–9.
16. Zamkova M, Kalinina A, Silaeva Y, Persiyantseva N, Bruter A, Deikin A, et al. Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR α transgenic mice and

- in vitro experiments. *Oncotarget*. 2019; 10: 4808–21.
17. Pobezinskij LA, Pobezinskaya EL, Grinenko TS, CHervonskij AV, Kazanskij DB. Perifericheskij pul T-kletok CD8⁺ sodержit limfocity s antigenspecificheskimi receptorami, raspoznayushchimi singennnye molekuly MNS klassa II. *Ontogenez*. 2004; 35 (3): 183–9.
 18. Silaeva Y, Kalinina A, Vagida M, Khromykh LM, Deikin AV, Ermolkevich TG, et al. Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β -chain expression. *Biochemistry (Moscow)*. 2013; 78: 549–59.
 19. Tang D, Chen M, Huang X, Zhang G, Zeng L, Zhang G, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS ONE*. 2023; 18 (11): e0294236.
 20. Listman JA, Rimm IJ, Wang Y, Geller MC, Tang JC, Ho S, et al. Plasticity of the T cell receptor repertoire in TCR beta-chain transgenic mice. *Cell Immunol*. 1996; 167 (1): 44–55.
 21. Ewing C, Allan W, Daly K, Hou S, Cole GA, Doherty PC, et al. Virus-specific CD8⁺ T-cell responses in mice transgenic for a T-cell receptor beta chain selected at random. *J Virol*. 1994; 68 (5): 3065–70.
 22. Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol*. 2012; 88 (9): 4135–40.
 23. Jardim DL, Goodman A, de Melo Gagliato D, Kurzrock R. The Challenges of Tumor Mutational Burden as an Immunotherapy Biomarker. *Cancer Cell*. 2021; 39 (2): 154–73.
 24. Aran A, Garrigós L, Curigliano G, Cortés J, Martí M. Evaluation of the TCR Repertoire as a Predictive and Prognostic Biomarker in Cancer: Diversity or Clonality? *Cancers (Basel)*. 2022; 14 (7): 1771.
 25. Wilczyński JR, Nowak M. Cancer Immunoediting: Elimination, Equilibrium, and Immune Escape in Solid Tumors. In: Klink M., Szulc-Kielbik I, editors. *Interaction of Immune and Cancer Cells. Experientia Supplementum*, vol 113: Springer, 2022.
 26. Charles J, Mouret S, Challende I, Leccia MT, De Fraipont F, Perez S, et al. T-cell receptor diversity as a prognostic biomarker in melanoma patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2020; 33 (4): 612–24.
 27. Qian L, Zhaohui Z, Yaping X, Zhentian L, Zhentao L, Qiqi W, et al. Blood T cell diversity associated with the prognosis of advanced non-small cell lung carcinoma treated with first-line pemetrexed based chemotherapy. *Thorac Cancer*. 2021; 12 (7): 997–1005.
 28. Abed A, Beasley AB, Reid AL, Law N, Calapre L, Millward M, et al. Circulating pre-treatment T-cell receptor repertoire as a predictive biomarker in advanced or metastatic non-small-cell lung cancer patients treated with pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy. *ESMO Open*. 2023; 8 (6): 102066.
 29. Manuel M, Tredan O, Bachelot T, Clapisson G, Courtier A, Parmentier G, et al. Lymphopenia combined with low TCR diversity (divpenia) predicts poor overall survival in metastatic breast cancer patients. *Oncoimmunology*. 2012; 1 (4): 432–40.
 30. Jia Q, Zhou J, Chen G, Shi Y, Yu H, Guan P, et al. Diversity index of mucosal resident T lymphocyte repertoire predicts clinical prognosis in gastric cancer. *Oncoimmunology*. 2015; 4 (4): e1001230.
 31. Jin YB, Luo W, Zhang GY, Lin KR, Cui JH, Chen XP, et al. TCR repertoire profiling of tumors, adjacent normal tissues, and peripheral blood predicts survival in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2018; 67 (11): 1719–30.
 32. Cui JH, Lin KR, Yuan SH, Jin YB, Chen XP, Su XK, Jet al. TCR Repertoire as a Novel Indicator for Immune Monitoring and Prognosis Assessment of Patients With Cervical Cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 2729.
 33. Fulop T, Larbi A, Pawelec G, Khalil A, Cohen AA, Hirokawa K, et al. Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2023; 64 (2): 109–22.
 34. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014; 192 (6): 2689–98.
 35. Shevryev DV, Tereshchenko VP, Kozlov VA. Gomeostaticeskaya proliferaciya: ot normy k patologii. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2018; 21 (2): 91–105. Russian.
 36. Montégut L, López-Otín C, Kroemer G. Aging and cancer. *Mol Cancer* 2024; 23 (1): 106.
 37. Kalinina AA, Ziganshin RK, Silaeva YY, Sharova NI, Nikonova MF, Persiyantseva NA, et al. Physiological and Functional Effects of Dominant Active TCR α Expression in Transgenic Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6527.

ПЕРИВАСКУЛЯРНЫЕ МАСТОЦИТЫ И АНГИОГЕНЕЗ В ОПУХОЛЕВОМ МИКРООКРУЖЕНИИ СИНОВИАЛЬНОЙ САРКОМЫ

Д. В. Буланов^{1,2}, Д. Р. Махачев^{1✉}, М. А. Сунцов¹, Д. С. Губич¹, Ю. Д. Филиппова¹, А. А. Крутилина¹, А. В. Свояк¹, А. А. Иванникова¹, Р. М. Габибуллаев³

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Пироговский Университет), Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н. Н. Приорова, Москва, Россия

³ Научный медицинский исследовательский центр эндокринологии имени И. И. Дедова, Москва, Россия

Синовиальная саркома характеризуется выраженной гистологической и молекулярной гетерогенностью, а ангиогенез и клетки врожденного иммунитета рассматривают как потенциальные источники прогностических маркеров и терапевтических мишеней. Целью исследования было оценить взаимосвязь количественных и пространственных характеристик мастоцитов с ангиогенезом в опухолевом микроокружении синовиальной саркомы и их прогностическую значимость. Проанализировано 140 случаев синовиальной саркомы с применением иммуногистохимии (триптаза/CD117, CD31/CD34, VEGF-A, α -SMA, CD3/CD8, CD68/CD163) и цифровой морфометрии с нормированием на 1 мм². Отдельно оценивали интратуморную, перитуморальную и периваскулярную (≤ 50 мкм от CD31⁺/CD34⁺ сосудов) зоны, а также индекс дегрануляции мастоцитов. Мастоциты выявлялись во всех наблюдениях, их плотность и признаки дегрануляции были максимальны в периваскулярной зоне. Периваскулярные мастоциты положительно коррелировали с микрососудистой плотностью и экспрессией VEGF-A и обратно — с перичитарным покрытием по α -SMA, эти связи сохранялись после учета CD163⁺-макрофагов. Высокие значения микрососудистой плотности и периваскулярных мастоцитов ассоциировались с неблагоприятной выживаемостью, тогда как выраженный CD8⁺-инфильтрат — с лучшими исходами. Разработанный интегральный Mast-Angio Score, объединяющий периваскулярную плотность и дегрануляцию мастоцитов, микрососудистую плотность и VEGF-A, повышает точность прогностической стратификации и может служить морфологической основой для обоснования комбинированной антиангиогенной и иммунной терапии.

Ключевые слова: тучные клетки, триптаза, ангиогенез, микрососудистая плотность, микроокружение, синовиальная саркома, цифровая морфометрия

Вклад авторов: Д. В. Буланов — руководство исследованием, разработка концепции и дизайна работы, редактирование текста статьи; Д. Р. Махачев, М. А. Сунцов, Д. С. Губич — анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование; Ю. Д. Филиппова, А. А. Крутилина, Р. М. Габибуллаев, А. В. Свояк, А. А. Иванникова — сбор клинических данных, редактирование.

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

Статья получена: 07.10.2025 **Статья принята к печати:** 05.11.2025 **Опубликована онлайн:** 21.11.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.059

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/>).

PERIVASCULAR MAST CELLS AND ANGIOGENESIS IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT OF SYNOVIAL SARCOMA

Bulanov DV^{1,2}, Makhachev DR^{1✉}, Suntsov MA¹, Gubich DS¹, Filippova YD¹, Krutilina AA¹, Svoyak AV¹, Ivannikova AA¹, Ghabibullaev RM³

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Priorov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russia

³ Dedov Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

Synovial sarcoma is characterized by marked histological and molecular heterogeneity, and angiogenesis as well as innate immune cells are considered potential sources of prognostic markers and therapeutic targets. This study aimed to evaluate the relationship between the quantitative and spatial characteristics of mast cells and angiogenesis in the tumor microenvironment of synovial sarcoma, as well as their prognostic significance. Using immunohistochemistry (tryptase/CD117, CD31/CD34, VEGF-A, α -SMA, CD3/CD8, CD68/CD163) and digital morphometry normalized to 1 mm², we analyzed 140 cases of synovial sarcoma. The intratumoral, peritumoral, and perivascular (≤ 50 μ m from CD31⁺/CD34⁺ vessels) zones, as well as the mastocyte degranulation index, were evaluated separately. Mast cells were detected in all observations; their density and signs of degranulation were greatest in the perivascular zone. Perivascular mast cells were positively correlated with both microvessel density and VEGF-A expression, and inversely correlated with α -SMA pericyte coverage; these relationships remained significant even after accounting for CD163⁺ macrophages. A high microvessel density and increased perivascular mast cell counts were associated with an unfavorable survival prognosis, while pronounced CD8⁺ infiltration predicted better outcomes. The developed integral Mast-Angio Score, which combines perivascular density, mast cell degranulation, microvessel density, and VEGF-A expression, improves the accuracy of prognostic stratification and can serve as a morphological basis for justifying combined antiangiogenic and immune therapy.

Keywords: mast cells, tryptase, angiogenesis, microvessel density, tumor microenvironment, synovial sarcoma, digital morphometry

Author contribution: Bulanov DV — study supervision, design, and conceptualization, article editing; Makhachev DR, Suntsov MA, Gubich DS — data analysis and interpretation, article authoring, editing; Filippova YuD, Krutilina AA, Ghabibullaev RM, Svoyak AV, Ivannikova AI — collection of the clinical data, article editing.

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

Received: 07.10.2025 **Accepted:** 05.11.2025 **Published online:** 21.11.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.059

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/>).

Синовиальная саркома (СС) составляет 5–10% сарком мягких тканей и характеризуется агрессивным клиническим течением, высокой частотой метастазов и ограниченной эффективностью применения стандартной химио- и иммунотерапии. Это усиливает интерес к изучению опухолевого микроокружения (tumor microenvironment, TME), особенно клеток врожденного иммунитета и ангиогенеза, как потенциальных источников прогностических маркеров и терапевтических мишеней [1–3].

Мастоциты (тучные клетки) являются резидентными клетками врожденного иммунитета, содержащими гранулы с триптазой, химазой, гистамином, цитокинами и факторами роста. В опухолевой ткани они могут оказывать как проопухолевое действие, усиливая ангиогенез, ремоделирование матрикса и иммуносупрессию (через VEGF, триптазу, IL-8, TNF β), так и антиопухолевое, выделяя TNF α , гранзим В, гепарин и медиаторы, способные индуцировать апоптоз опухолевых клеток или подавлять ангиогенез. Выделяют два основных фенотипа мастоцитов: MCT (только триптаза⁺) и MCTC (триптаза⁺/химаза⁺): их распределение и функциональная роль зависят от типа опухоли и микроокружения [4–6].

Несмотря на то что увеличение числа триптаза⁺-мастоцитов описано в различных солидных опухолях и нередко сопровождается повышением микрососудистой плотности (microvessel density, MVD), их роль в СС остается недостаточно изученной. Литературные данные противоречивы: с одной стороны, мастоциты рассматривают как источник проангиогенных факторов, с другой — приводятся сведения об их возможной антиопухолевой функции и связи с благоприятным прогнозом в отдельных нозологиях. При этом в большинстве работ отсутствует пространственная оценка, учитывающая локализацию мастоцитов относительно сосудов, хотя именно периваскулярная зона является ключевой для ангиогенеза и доставки опухоли питательных веществ [4–9].

Еще одной проблемой является методическая неоднородность: исследователи используют разные панели иммуногистохимических маркеров (триптаза, CD117), способы нормирования (на поле зрения или на 1 мм²), редко выделяют интра- и перитуморальные зоны и почти не оценивают периваскулярную плотность мастоцитов или степень их дегрануляции. Для СС отсутствуют стандартизированные критерии количественной и пространственной оценки мастоцитов во взаимосвязи с ангиогенезом (CD31/CD34, VEGF, MVD) и клинико-прогностическими данными [10].

С учетом выявленной роли мастоцитов как активных регуляторов сосудистой ниши и модуляторов ангиогенеза настоящее исследование было направлено на комплексную морфологическую характеристику этих клеток в ткани синовиальной саркомы. Особое внимание уделено их количественным и топографическим параметрам, включая периваскулярную плотность и степень дегрануляции, а также связи с ангиогенными показателями опухолевого микроокружения.

Цель исследования — оценить взаимосвязь количественных и пространственных характеристик мастоцитов с ангиогенезом в опухолевом микроокружении синовиальной саркомы и определить их прогностическую значимость.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения поставленной цели проведено одноцентровое ретроспективное исследование, направленное на

комплексную морфометрическую характеристику мастоцитов и ангиогенных показателей при синовиальной саркоме. Работа включала стандартизованную иммуногистохимическую оценку мастоцитов (триптаза⁺/CD117⁺, плотность, периваскулярная локализация, индекс дегрануляции) и сосудистых параметров (CD31/CD34, микрососудистая плотность, VEGF-A, α -SMA), дополненную цифровой морфометрией с нормированием на площадь среза (мм²). Анализ проводили отдельно для интра- и перитуморальных зон с последующим сопоставлением клинико-морфологических характеристик и данных выживаемости пациентов.

В исследование включили 140 пациентов, наблюдавшихся в ФГАОУ ВО «РНИМУ имени Н. И. Пирогова». Критерий включения: наличие морфологически подтвержденной синовиальной саркомы (СС). Когорту составили 74 мужчины и 66 женщин; возраст — от 4 до 84 лет (медиана 18,5 года). Использовали архивные гистологические стекла и парафиновые блоки (FFPE). Включали случаи первичной диагностики или консультативного пересмотра при наличии достаточного объема опухолевой ткани и клинико-анамнестических данных (возраст, пол, локализация, размер, стадия, лечение). Критерии исключения: случаи с сомнительным диагнозом после пересмотра, случаи с критически недостаточным количеством ткани; повторные образцы биопсии одного очага.

Оценивали гистологический подтип (монофазная/бифазная), наличие некроза, митотическую активность/Ki-67, стадию и метастатический статус. Возрастную стратификацию проводили по двум схемам: ≤ 24 и ≥ 25 лет, а также < 18 и ≥ 18 лет, что отражает клинико-эпидемиологические особенности СС.

Имуногистохимическое исследование выполняли на автоматическом стайнере Leica Bond-III с использованием RTU-антител Novocastra (Leica Biosystems, Великобритания) и детекции Bond Polymer Refine (DAB); докрасивание — гематоксилином Майера. Антигенная репривеликация — ER1 (pH 6,0) и/или ER2 (pH 9,0) согласно IFU. Панель включала триптазу и CD117 (мастоциты), CD31 и CD34 (микрососудистая плотность), α -SMA (перичитарное покрытие), VEGF-A (ангиогенная активность), CD3/CD8 (Т-клетки), CD68/CD163 (макрофаги). Дополнительно оценивали VEGFR2 (в эндотелии) и PDGFR α (в строме/периваскулярно); порог позитивности — $\geq 10\%$ позитивных клеток; полуквантитативно применяли H-score (0–300).

Цифровую морфометрию выполняли на сканированных препаратах с нормированием на 1 мм², отдельной оценкой интра- и перитуморальных зон. Периваскулярной считали полосу ≤ 50 мкм от CD31⁺/CD34⁺-сосудов; сосуды > 50 мкм при расчете MVD исключали. MVD определяли по методу Weidner в «горячих полях» площадью $\sim 0,95$ мм² и глобально по WSI; дополнительно учитывали перичитарное покрытие по α -SMA.

Статистический анализ проводили в R 4.3.2. Нормальность — Shapiro–Wilk; сравнения — Mann–Whitney U/Kruskal–Wallis; корреляции — Спирмен. Для учета макрофагального компонента применяли частичную корреляцию Спирмена с контролем по CD163⁺ и множественную линейную регрессию для MVD. Множественные сравнения корректировали по FDR (Benjamini–Hochberg). Выживаемость (MFS/OS) — Kaplan–Meier и модели Кокса. Статистически значимым считали $p < 0,05$.

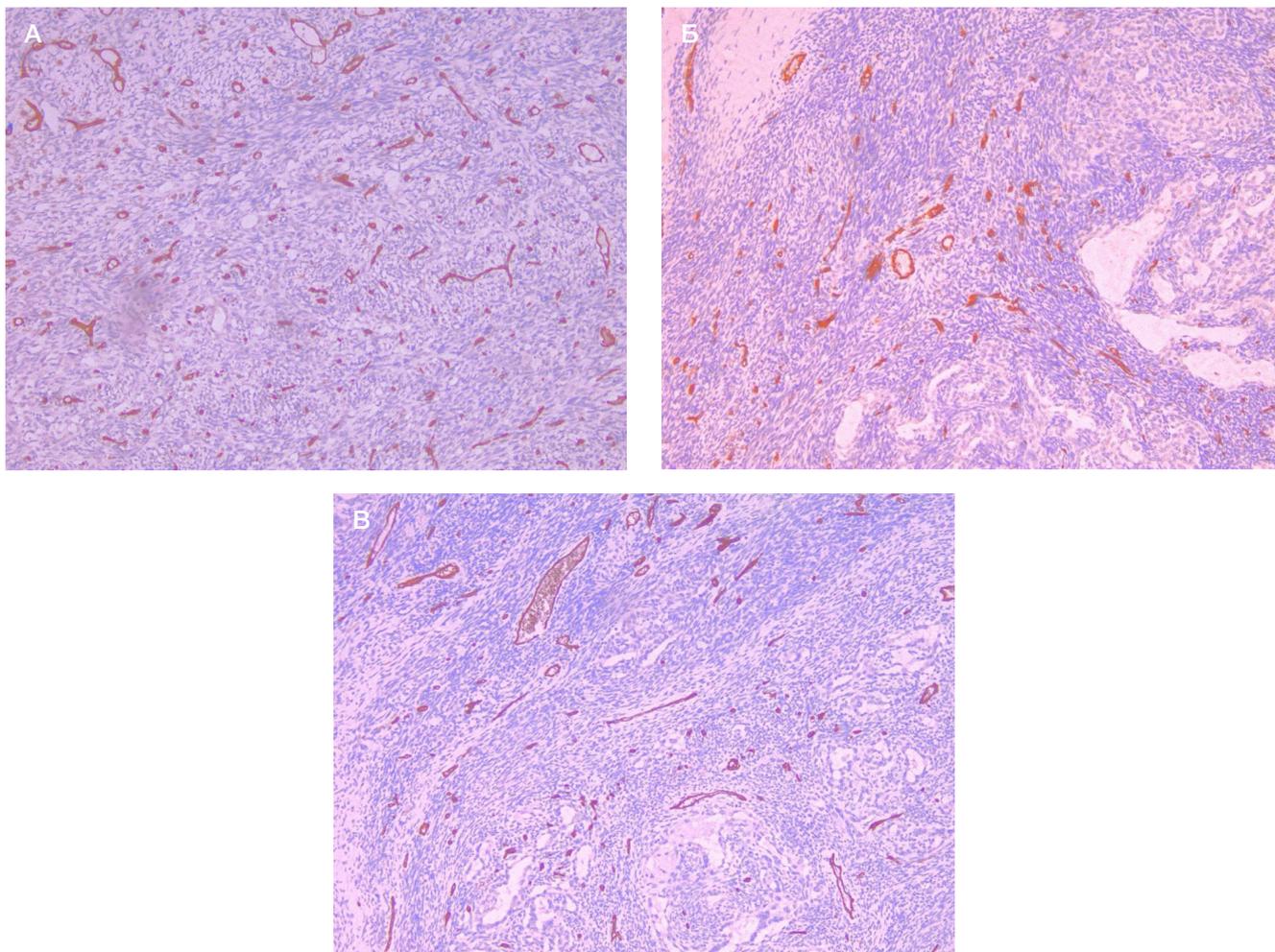


Рис. 1. А. Интратуморальная зона (CD31, $\times 200$). Плотная сеть тонкостенных капилляров с ветвящимися и петельными контурами, соответствующая «горячим» полям ангиогенеза. **Б.** Перитуморальная зона (CD31, $\times 200$). Упорядоченная сосудистая сеть с меньшей плотностью и ориентацией сосудов вдоль коллагеновых пучков. **В.** Перитуморальная зона (CD31, $\times 200$). Мозаичная микрососудистая пролиферация с сочетанием мелких и средних сосудов, отражающая пространственную гетерогенность ангиогенеза

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммуногистохимическое и морфометрическое исследование выполняли во всех 140 наблюдениях. Иммунный инфильтрат синовиальной саркомы характеризовался типичным для «сдержанно-холодного» TME профилем: низкой плотностью CD3⁺/CD8⁺-Т-лимфоцитов и выраженным преобладанием CD68⁺/CD163⁺-макрофагов, что согласуется с литературными данными по саркомам. Между монофазными и бифазными вариантами достоверных различий в микрососудистой плотности (MVD) не выявлено [11, 12].

Морфологический анализ CD31-позитивного сосудистого русла показал четкие зональные различия. В интратуморальных участках формировалась плотная сеть тонкостенных капилляров с ветвящимися и петельными контурами, соответствующая «горячим» полям ангиогенеза. Эндотелий был равномерно позитивным по CD31, без признаков атипии, что отражает активный sprouting-ангиогенез. В перитуморальной строме сосудистая сеть выглядела более упорядоченной, с меньшей плотностью и ориентацией вдоль коллагеновых пучков. Вблизи инвазивного фронта наблюдалась мозаичная микрососудистая пролиферация с сочетанием мелких и средних сосудов, подтверждающая пространственную гетерогенность ангиогенеза. Эти особенности представлены на рис. 1А–В, а их

количественные различия — на рис. 2, где медианная MVD в интратуморальной зоне составила ~ 110 сосудов/ мм^2 , а в перитуморальной — около 80–90 сосудов/ мм^2 .

При окрашивании по CD34 отмечены аналогичные тенденции, но с ожидаемо более высокими значениями (интратуморальная медиана ~ 127 сосудов/ мм^2 , перитуморальная ~ 95 сосудов/ мм^2), что связано с более широкой маркировкой эндотелиальных профилей. Таким образом, CD31 предпочтительно отражает активные ангиогенные поля, тогда как CD34 фиксирует совокупность зрелых и незрелых сосудов.

Тучные клетки (ТК) визуализировались как CD117⁺ элементы преимущественно овальной формы с четкой мембранной и цитоплазматической позитивностью. Их распределение носило выраженный топографический характер: в периваскулярной полосе ≤ 50 мкм от CD31⁺/CD34⁺-сосудов плотность ТК была наибольшей, достигая медианы ~ 154 кл./ мм^2 , тогда как в интратуморальных участках — около 93 кл./ мм^2 ; перитуморальная зона занимала промежуточное положение (~ 144 кл./ мм^2). Пространственная концентрация ТК сопровождалась признаками частичной дегрануляции — экстрацеллюлярные гранулы определялись по периферии клеток, что указывает на функциональную активность. В интратуморальной паренхиме ТК встречались преимущественно одиночно, без ориентации вдоль сосудов. Эти наблюдения

иллюстрируют рис. 3А–Б, а количественное сравнение представлено на рис. 4.

Анализ ангиогенных маркеров показал умеренно высокую экспрессию VEGF-A (H-score \approx 150 [100–220]) и частичное перичитарное покрытие сосудов по α -SMA (~25 %), что отражает преобладание морфологически незрелых сосудов. Экспрессия рецепторов VEGFR2 и PDGFR α отмечалась в 20% и 46–70% случаев соответственно, что подтверждает участие обеих сигнальных осей в регуляции ангиогенеза при синовиальной саркоме (рис. 5 А, Б).

Корреляционный анализ (рис. 6) подтвердил прочную связь между мастоцитарной активностью и ангиогенезом: периваскулярная плотность ТК положительно коррелировала с MVD в зонах hot-spot ($r_s = 0,70$) и при глобальной оценке ($r_s = 0,62$), а также с VEGF-A ($r_s = 0,40$); индекс дегрануляции — с MVD ($r_s = 0,55$). Эти зависимости сохранялись после поправки на CD163⁺-макрофаги, что подтверждает самостоятельный вклад мастоцитов в ангиогенез. Обратная корреляция MVD с перичитарным покрытием α -SMA ($r_s = -0,35$) указывает на доминирование незрелых сосудов в зонах мастоцитарной активности.

Возрастной анализ (≤ 24 и ≥ 25 лет; < 18 и ≥ 18 лет) не выявил статистически значимых различий по MVD, VEGF-A и плотности ТК ($p > 0,05$), что исключает возраст как модифицирующий фактор ангиогенного профиля.

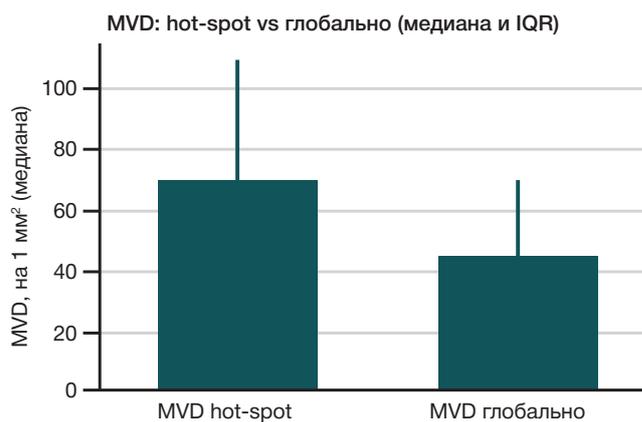
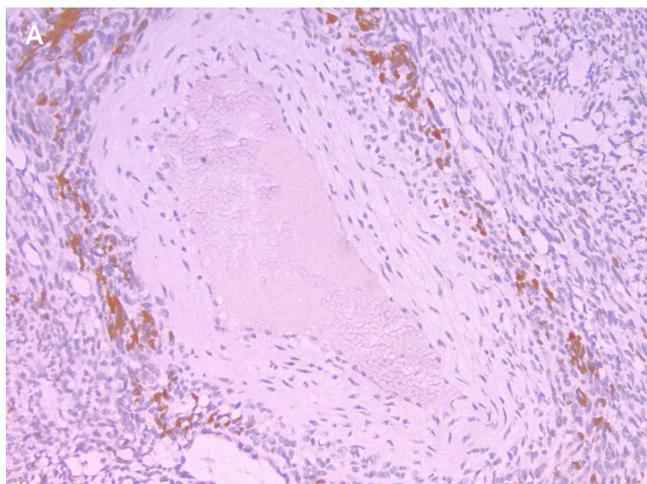


Рис. 2. Микрососудистая плотность (MVD, CD31): сравнение «горячих полей» (Weidner) и глобальной оценки по всему срезу

В подгруппе с данными по выживаемости повышенные показатели MVD и периваскулярных ТК ассоциировались с менее благоприятными исходами, тогда как высокая плотность CD8⁺-Т-лимфоцитов — с лучшей MFS/OS.

На основе совокупности этих параметров разработан интегральный Mast-Angio Score, включающий периваскулярную плотность ТК, MVD, VEGF-A и индекс дегрануляции. Внутренняя валидация показала улучшение c-index и показателей NRI/IDI по сравнению с

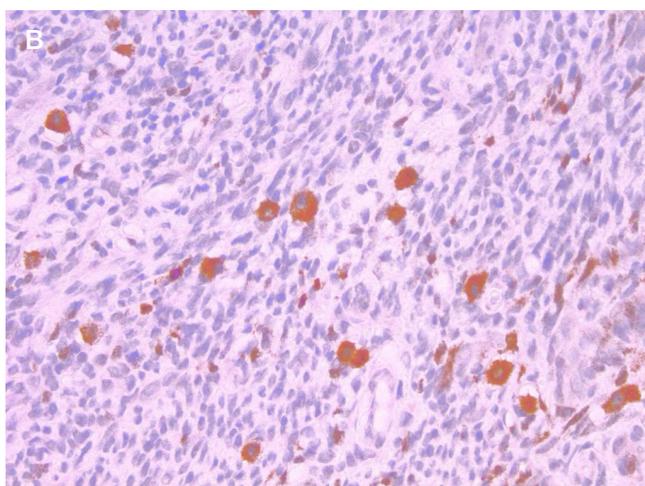
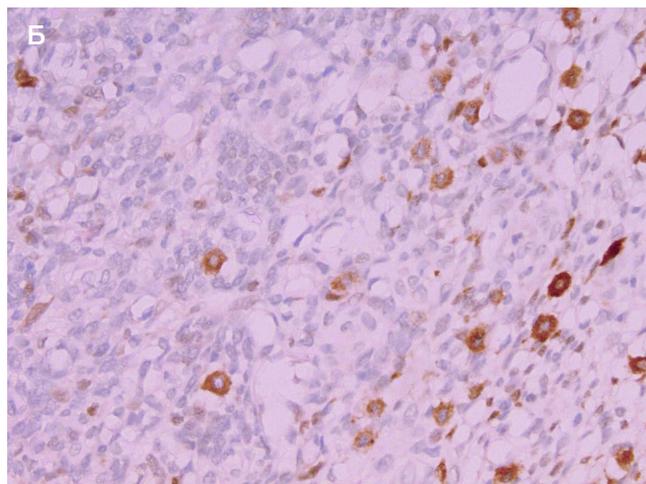


Рис. 3. А. Периваскулярная зона ≤ 50 мкм (CD117, $\times 200$). Кластеризация тучных клеток вдоль сосудистой стенки; отдельные клетки с экстрацеллюлярными гранулами (косвенный признак дегрануляции). Б. Периваскулярная зона ≤ 50 мкм (CD117, $\times 400$). Скопления зрелых гранулированных тучных клеток, формирующих манжетирование сосудов. В. Интратуморная зона (CD117, $\times 400$). Одиночные тучные клетки без выраженной периваскулярной ориентации, с частичной утратой гранулярности

традиционными клинико-морфологическими моделями, что подтверждает прогностическую значимость мастоцитарно-ангиогенных метрик при синовиальной саркоме [13–15].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные морфологические и количественные данные подтверждают активный ангиогенез и тесное сосудисто-иммунное взаимодействие в микроокружении синовиальной саркомы. Повышенная интратуморная микрососудистая плотность (MVD) по CD31 и CD34 отражает преобладание sprouting-ангиогенеза в паренхиме опухоли, тогда как перитуморальная строма характеризуется более низкой и структурированной сосудистой сетью. Разница между маркерами объясняется различиями в их специфичности: CD31 преимущественно выявляет функционирующий эндотелий, в то время как CD34 дополнительно маркирует незрелые эндотелиальные структуры. Поэтому CD31 целесообразно использовать как базовый маркер для межзональных сравнений, а CD34 — как чувствительный показатель расширенного спектра сосудистых структур.

Ключевым наблюдением является выраженная периваскулярная аккумуляция CD117⁺-тучных клеток в полосе ≤ 50 мкм от микрососудов при сравнительно меньшей их плотности в интратуморной паренхиме. Данный паттерн согласуется с известной способностью тучных клеток синтезировать медиаторы ангиогенеза — триптазу, гистамин, VEGF-A, FGF-2, протеазы и хемокины, участвующие в ремоделировании внеклеточного матрикса и повышении сосудистой проницаемости. Такое пространственное сближение ТК с микрососудами создает условия для паракринного воздействия на эндотелий и перициты, усиливая рост и стабилизацию новообразованных сосудов. Аналогичные механизмы описаны при саркоме Юинга и остеосаркоме, где плотность тучных клеток положительно коррелирует с MVD и экспрессией VEGF.

Наблюдаемые корреляции между периваскулярной плотностью ТК, MVD и уровнем VEGF-A подтверждают участие мастоцитов в регуляции ангиогенеза. Обратная связь между MVD и перичитарным покрытием α -SMA отражает преобладание морфологически незрелых сосудов в зонах активного ангиогенеза. Независимость этих ассоциаций от плотности CD163⁺ макрофагов подчеркивает автономный вклад тучных клеток в ангиогенные процессы.

Полученные результаты согласуются с современными представлениями о пространственной организации

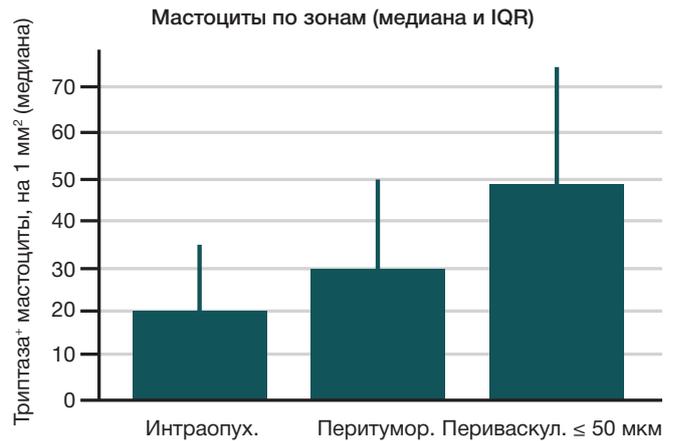


Рис. 4. Плотность триптаза⁺-тучных клеток в интраопухоловой, перитуморальной и периваскулярной (≤ 50 мкм от CD31⁺/CD34⁺-сосудов) зонах

клеточных экосистем сарком, где ангиогенные и иммунные ниши формируют взаимосвязанные микросреды, влияющие на прогноз заболевания [16]. Наши данные уточняют один из аспектов этой модели — роль мастоцитов как активных элементов сосудистой ниши. Описанная периваскулярная концентрация ТК и их дегрануляция подтверждают выводы о тканевой гетерогенности мастоцитов и их участии в рекрутировании других клеток врожденного иммунитета [17].

Клиническое значение выявленного паттерна заключается в том, что высокая MVD в сочетании с периваскулярной аккумуляцией ТК формирует ангиогенный фенотип опухолевого микроокружения, связанный с неблагоприятным течением. Подобные сосудисто-иммунные профили считаются потенциальной мишенью комбинированных стратегий лечения, объединяющих антиангиогенные препараты с иммунотерапией [18]. Это согласуется с концепцией, согласно которой мастоциты можно рассматривать как перспективную точку приложения для модуляции противоопухолевого иммунного ответа, а также с данными, указывающими на возможность терапевтического воздействия на мастоциты при сочетанном применении ингибиторов контрольных точек [19, 20].

Таким образом, наши результаты расширяют существующие представления о сосудисто-иммунных взаимодействиях при синовиальной саркоме, подчеркивая ключевую роль периваскулярных мастоцитов в формировании ангиогенного фенотипа опухолевого микроокружения и возможный терапевтический потенциал их модуляции.

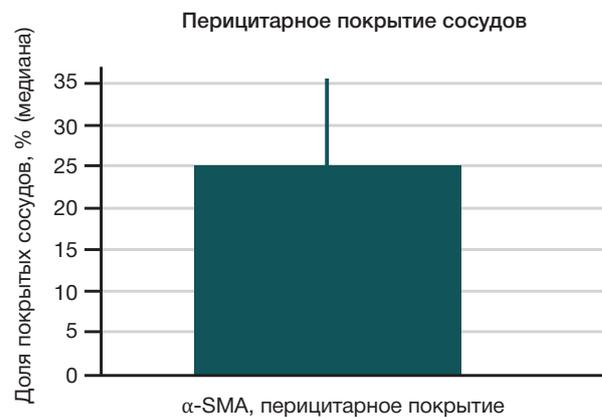
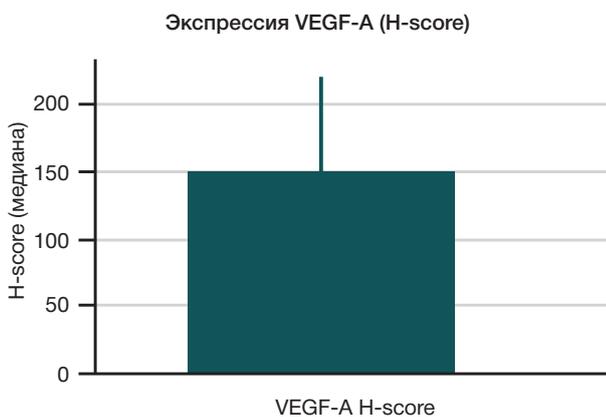


Рис. 5. А. Экспрессия VEGF-A (H-score) в тканях синовиальной саркомы. Б. Перичитарное покрытие сосудов по α -SMA

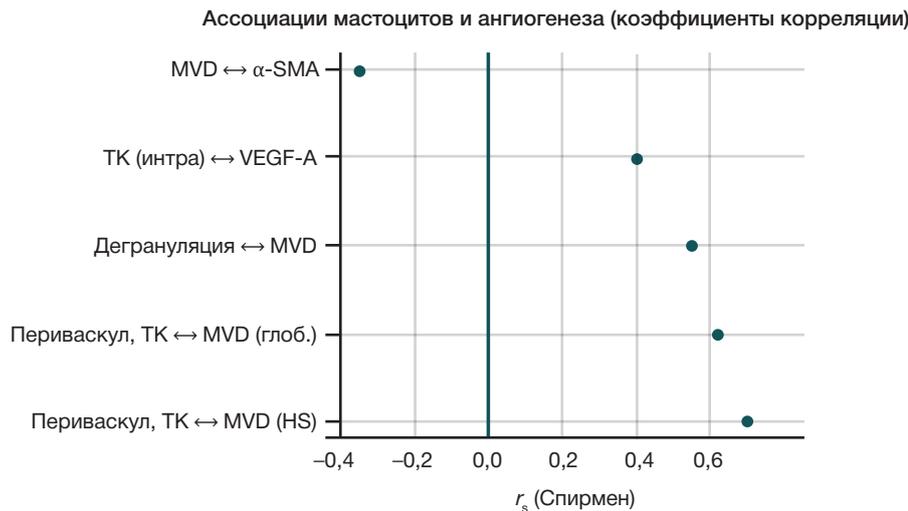


Рис. 6. Корреляции между плотностью мастоцитов, MVD, VEGF-A и перицитарным покрытием α-SMA (коэффициенты Спирмена)

ВЫВОДЫ

Периваскулярные мастоциты при синовиальной саркоме формируют воспроизводимый топографический паттерн с наибольшей плотностью в зоне ≤ 50 мкм от CD31⁺/CD34⁺-микрососудов и более высокой степенью дегрануляции по сравнению с паренхимой. Их накопление сопряжено с ангиогенным фенотипом TME: выявлена положительная связь с MVD (как в hot-spots, так и при глобальной оценке) и экспрессией VEGF-A при одновременной отрицательной ассоциации с перицитарным покрытием по α-SMA, что указывает на преобладание морфологически незрелых сосудов. Эти зависимости сохраняются после учета CD163⁺-макрофагов, подтверждая самостоятельный вклад мастоцитов в сосудистую нишу. Возрастная стратификация не показала клинически значимого влияния на мастоцитарно-ангиогенные метрики. В подгруппе с данными выживаемости более высокая

MVD и периваскулярная плотность мастоцитов ассоциировались с худшими исходами, тогда как выраженный CD8⁺-инfiltrат — с лучшими. Предложенный интегральный индекс Mast-Angio Score, объединяющий периваскулярную плотность и дегрануляцию мастоцитов, MVD и VEGF-A, повысил дискриминационную способность прогностической модели (рост c-index, улучшение NRI/IDI) относительно стандартных клинико-морфологических признаков. Стандартизированная ИГХ-оценка этих показателей на архивных стеклопрепаратах и FFPE-блоках технологически выполнима и может быть интегрирована в синоптический отчет как дополнительный слой стратификации риска. Полученные результаты создают обоснование для клинических исследований комбинированных подходов — антиангиогенной терапии в сочетании с модуляцией эффекторных функций мастоцитов и/или иммунотерапией — в тщательно отобранных подгруппах пациентов с ангиогенно активным профилем.

Литература

- Fiore M, Sambri A, Spinnato P, et al. The biology of synovial sarcoma: state-of-the-art and future perspectives. *Curr Treat Options Oncol.* 2021; 22 (12): 109. DOI: 10.1007/s11864-021-00914-4.
- Gazendam AM, Popovic S, Munir S, et al. Synovial sarcoma: a clinical review. *Curr Oncol.* 2021; 28 (3): 1909–20. DOI: 10.3390/curroncol28030177.
- Ribatti D. Tryptase and tumor angiogenesis. *Front Oncol.* 2024; 14: 1500482. DOI: 10.3389/fonc.2024.1500482.
- Ammendola M, Gadaleta CD, Patruno R, et al. Mast cells positive for c-Kit receptor and tryptase correlate with angiogenesis in cancerous and adjacent normal pancreatic tissue. *Cells.* 2021; 10 (2): 444. DOI: 10.3390/cells10020444.
- Segura-Villalobos D, Bazany-Rosenzweig NR, Mayoral RJ, et al. Mast cell-tumor interactions: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cells.* 2022; 11 (3): 349. DOI: 10.3390/cells11030349.
- Liu Z, Wang L, Wang J, et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8: 227. DOI: 10.1038/s41392-023-01460-1.
- Panagi M, Lesuy Y, Tosti R, et al. Stabilizing tumor-resident mast cells restores T-cell infiltration in sarcomas and potentiates PD-L1 inhibition. *Clin Cancer Res.* 2024; 30 (11): 2582–97. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-0246.
- Toulmonde M, Guégan J-P, Spalato-Ceruso M, et al. Reshaping the tumor microenvironment of cold soft-tissue sarcomas with anti-angiogenics: a phase 2 trial of regorafenib combined with avelumab. *Signal Transduct Target Ther.* 2025; 10: 202. DOI: 10.1038/s41392-025-02278-9.
- Piccolo S, Panciera T, Contessotto P, Cordenonsi M. YAP/TAZ as master regulators in cancer: modulation, function and therapeutic approaches. *Nat Cancer.* 2023; 4 (1): 9–26. DOI: 10.1038/s43018-022-00473-z.
- Chapeau EA, Sansregret L, Galli GG, Chène P, Wartmann M, Mourikis TP, et al. Direct and selective pharmacological disruption of the YAP-TEAD interface by IAG933 inhibits Hippo-dependent and RAS-MAPK-altered cancers. *Nat Cancer.* 2024; 5 (7): 1102–20. DOI: 10.1038/s43018-024-00754-9.
- Luk S, Chokshi PR, Torres-Rodriguez I, et al. Immunological differences between monophasic and biphasic synovial sarcoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2024; 74 (1): 31. DOI: 10.1007/s00262-024-03868-2.
- Wisdom AJ, Mowery YM, Hong CS, et al. Single cell analysis reveals distinct immune landscapes in transplant and primary sarcomas that determine response or resistance to immunotherapy. *Nat Commun.* 2020; 11: 6410. DOI: 10.1038/s41467-020-19917-0.
- Medina-Ceballos E, Liotta A, Ali S, et al. The prognostic impact of the tumor immune microenvironment in synovial sarcoma: an immunohistochemical analysis using digital pathology and conventional scoring. *J Pers Med.* 2025; 15 (5): 169. DOI: 10.3390/jpm15050169.
- Giner F, Medina-Ceballos E, López-Reig R, et al. The combined

- immunohistochemical expression of GLI1 and BCOR in synovial sarcomas for the identification of three risk groups and their prognostic outcomes: a study of 52 patients. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (14): 7615. DOI: 10.3390/ijms25147615.
15. Recine F, Piciocchi S, De Vincenzo F, et al. Clinical and translational implications of immunotherapy in soft tissue and bone sarcomas. *Front Immunol.* 2024; 15: 1378398. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1378398.
 16. Subramanian A, Caswell DR, Wang H, et al. Sarcoma microenvironment cell states and ecosystems are associated with prognosis and predict response to immunotherapy. *Nat Cancer.* 2024; 5 (4): 642–58. DOI: 10.1038/s43018-024-00743-y.
 17. West PW, Bulfone-Paus S. Mast cell tissue heterogeneity and specificity of immune cell recruitment. *Front Immunol.* 2022; 13: 932090. DOI: 10.3389/fimmu.2022.932090.
 18. Spalato-Ceruso M, Valverde P, Italiano A. New strategies in soft tissue sarcoma treatment. *J Hematol Oncol.* 2024; 17 (1): 76. DOI: 10.1186/s13045-024-01580-3.
 19. Lichterman JN, Reddy SM. Mast Cells: A New Frontier for Cancer Immunotherapy. *Cells.* 2021; 10 (6): 1270. DOI: 10.3390/cells10061270.
 20. Ribatti D. New insights into the role of mast cells as a therapeutic target in cancer through the blockade of immune checkpoint inhibitors. *Front Med (Lausanne).* 2024; 11: 1373230. DOI: 10.3389/fmed.2024.1373230.

References

1. Fiore M, Sambri A, Spinnato P, et al. The biology of synovial sarcoma: state-of-the-art and future perspectives. *Curr Treat Options Oncol.* 2021; 22 (12): 109. DOI: 10.1007/s11864-021-00914-4.
2. Gazendam AM, Popovic S, Munir S, et al. Synovial sarcoma: a clinical review. *Curr Oncol.* 2021; 28 (3): 1909–20. DOI: 10.3390/curroncol28030177.
3. Ribatti D. Tryptase and tumor angiogenesis. *Front Oncol.* 2024; 14: 1500482. DOI: 10.3389/fonc.2024.1500482.
4. Ammendola M, Gadaleta CD, Patruno R, et al. Mast cells positive for c-Kit receptor and tryptase correlate with angiogenesis in cancerous and adjacent normal pancreatic tissue. *Cells.* 2021; 10 (2): 444. DOI: 10.3390/cells10020444.
5. Segura-Villalobos D, Bazany-Rosenzweig NR, Mayoral RJ, et al. Mast cell–tumor interactions: molecular mechanisms and clinical perspectives. *Cells.* 2022; 11 (3): 349. DOI: 10.3390/cells11030349.
6. Liu Z, Wang L, Wang J, et al. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2023; 8: 227. DOI: 10.1038/s41392-023-01460-1.
7. Panagi M, Lesuy Y, Tosti R, et al. Stabilizing tumor-resident mast cells restores T-cell infiltration in sarcomas and potentiates PD-L1 inhibition. *Clin Cancer Res.* 2024; 30 (11): 2582–97. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-0246.
8. Toulmonde M, Guégan J-P, Spalato-Ceruso M, et al. Reshaping the tumor microenvironment of cold soft-tissue sarcomas with anti-angiogenics: a phase 2 trial of regorafenib combined with avelumab. *Signal Transduct Target Ther.* 2025; 10: 202. DOI: 10.1038/s41392-025-02278-9.
9. Piccolo S, Panciera T, Contessotto P, Cordenonsi M. YAP/TAZ as master regulators in cancer: modulation, function and therapeutic approaches. *Nat Cancer.* 2023; 4 (1): 9–26. DOI: 10.1038/s43018-022-00473-z.
10. Chapeau EA, Sansregret L, Galli GG, Chène P, Wartmann M, Mourikis TP, et al. Direct and selective pharmacological disruption of the YAP–TEAD interface by IAG933 inhibits Hippo-dependent and RAS–MAPK-altered cancers. *Nat Cancer.* 2024; 5 (7): 1102–20. DOI: 10.1038/s43018-024-00754-9.
11. Luk S, Chokshi PR, Torres-Rodriguez I, et al. Immunological differences between monophasic and biphasic synovial sarcoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2024; 74 (1): 31. DOI: 10.1007/s00262-024-03868-2.
12. Wisdom AJ, Mowery YM, Hong CS, et al. Single cell analysis reveals distinct immune landscapes in transplant and primary sarcomas that determine response or resistance to immunotherapy. *Nat Commun.* 2020; 11: 6410. DOI: 10.1038/s41467-020-19917-0.
13. Medina-Ceballos E, Liotta A, Ali S, et al. The prognostic impact of the tumor immune microenvironment in synovial sarcoma: an immunohistochemical analysis using digital pathology and conventional scoring. *J Pers Med.* 2025; 15 (5): 169. DOI: 10.3390/jpm15050169.
14. Giner F, Medina-Ceballos E, López-Reig R, et al. The combined immunohistochemical expression of GLI1 and BCOR in synovial sarcomas for the identification of three risk groups and their prognostic outcomes: a study of 52 patients. *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (14): 7615. DOI: 10.3390/ijms25147615.
15. Recine F, Piciocchi S, De Vincenzo F, et al. Clinical and translational implications of immunotherapy in soft tissue and bone sarcomas. *Front Immunol.* 2024; 15: 1378398. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1378398.
16. Subramanian A, Caswell DR, Wang H, et al. Sarcoma microenvironment cell states and ecosystems are associated with prognosis and predict response to immunotherapy. *Nat Cancer.* 2024; 5 (4): 642–58. DOI: 10.1038/s43018-024-00743-y.
17. West PW, Bulfone-Paus S. Mast cell tissue heterogeneity and specificity of immune cell recruitment. *Front Immunol.* 2022; 13: 932090. DOI: 10.3389/fimmu.2022.932090.
18. Spalato-Ceruso M, Valverde P, Italiano A. New strategies in soft tissue sarcoma treatment. *J Hematol Oncol.* 2024; 17 (1): 76. DOI: 10.1186/s13045-024-01580-3.
19. Lichterman JN, Reddy SM. Mast Cells: A New Frontier for Cancer Immunotherapy. *Cells.* 2021; 10 (6): 1270. DOI: 10.3390/cells10061270.
20. Ribatti D. New insights into the role of mast cells as a therapeutic target in cancer through the blockade of immune checkpoint inhibitors. *Front Med (Lausanne).* 2024; 11: 1373230. DOI: 10.3389/fmed.2024.1373230.

РЕЗУЛЬТАТЫ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ IIA ФАЗЫ ИНГИБИТОРА RAS-ГТФАЗЫ («ИНГ-РАС») ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕЙ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Т. М. Кулинич, Е. А. Куколева, С. В. Гончаров, Е. А. Кудинова, И. А. Пучков [✉], О. И. Гончарова, В. В. Каминский, В. К. Боженко

Российский научный центр рентгенодиагностики, Москва, Россия

Перитонеальный канцероматоз остается одним из самых сложных вариантов диссеминации при раке желудка и толстой кишки. Он напрямую определяет прогноз заболевания и весьма резистентен к лечению. Использование существующих терапевтических подходов часто ограничено низким соотношением «польза–риск». Необходима разработка инновационных стратегий, направленных на преодоление молекулярных механизмов прогрессирования опухолей, ассоциированных с мутациями RAS, играющими важную роль в канцерогенезе как колоректального рака, так и рака желудка. Целью работы было оценить безопасность и эффективность нового пептидного ингибитора RAS-ГТФазы «Инг-Рас» при его включении в схему лечения пациентов с диагнозом рак желудка и толстой кишки III–IV стадий, включая пациентов с перитонеальным канцероматозом. В исследование было включено 35 пациентов с подтвержденными диагнозами рак желудка и толстой кишки III–IV стадий. Препарат «Инг-Рас» вводили в дозе 1,8 мг/кг двукратно с интервалом семь дней с помощью технологии внутрибрюшинной аэрозольной химиотерапии под давлением (PIPAC). Оценку первичной эффективности проводили на основании сравнения показателей общей (OS) и безрецидивной (PFS) одногодичной выживаемости пациентов КИ с группами исторического контроля. Показатели OS и PFS для пациентов клинического исследования составили 92,1 и 84,22% соответственно, что достоверно ($p < 0,05$) превышает значения данных показателей для группы исторического контроля — 50,8 и 65,25%. Таким образом, применение препарата «Инг-Рас» позволяет существенно повысить результаты лечения пациентов с распространенными формами колоректального рака и рака желудка.

Ключевые слова: перитонеальный канцероматоз, ингибитор RAS-ГТФазы, PIPAC-терапия, выживаемость без прогрессирования, безопасность, мутация KRAS G12C, KRAS, HRAS, NRAS

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации, рег. № ЕГИСУ 1023021500033-4-3.2.21;3.1.5.

Вклад авторов: Т. М. Кулинич — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, анализ полученных данных, написание текста; Е. А. Куколева — формирование групп пациентов, набор клинического материала, анализ результатов, написание текста; С. В. Гончаров — дизайн экспериментальной части, формирование групп пациентов, набор клинического материала, анализ результатов; Е. А. Кудинова, О. И. Гончарова — анализ клинико-экспериментальных результатов, написание и редактирование текста; И. А. Пучков, В. В. Каминский — формирование групп пациентов, анализ результатов, написание и редактирование текста; В. К. Боженко — концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом при ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России (протокол заседания № 4 от 28 апреля 2023 г.). Исследование 2022-1-«Инг-Рас» одобрено Минздравом России разрешением № 177 на проведение клинических исследований от 30.03.2023. Проведено в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Илья Александрович Пучков
ул. Профсоюзная, 86, 117997, г. Москва, Россия; poutchkov@mail.ru

Статья получена: 23.10.2025 **Статья принята к печати:** 21.11.2025 **Опубликована онлайн:** 09.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.065

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/>).

RESULTS OF PHASE IIA CLINICAL TRIAL OF THE RAS-GTPASE INHIBITOR («ING-RAS») FOR TREATMENT OF GASTROINTESTINAL TUMORS

Kulinich TM, Kukoleva EA, Goncharov SV, Kudinova EA, Puchkov IA [✉], Goncharova OI, Kaminsky VV, Bozhenko VK

Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Moscow, Russia

Peritoneal carcinomatosis remains one of the most challenging forms of dissemination in gastric and colorectal cancer. It directly determines the disease prognosis and is highly resistant to treatment. The use of the existing therapeutic approaches is often limited by low benefit-risk ratio. It is necessary to develop innovative strategies aimed at overcoming the molecular mechanisms of tumor progression associated with RAS mutations, which play a crucial role in the carcinogenesis of both colorectal and gastric cancer. The study aimed to estimate safety and preliminary efficacy of the novel peptide RAS-GTPase inhibitor «Ing-Ras» when included in the treatment regimen of patients with stage III–IV gastric and colorectal cancer, including patients with peritoneal carcinomatosis. A total of 35 patients with the confirmed diagnosis of stage III–IV gastric and colorectal cancer were included in the study. The «Ing-Ras» drug was administered at a dose of 1.8 mg/kg twice with a 7-day interval using the Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) technique. Primary efficacy was assessed by comparing the overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) rates of the clinical trial patients with historical control groups. The OS and PFS rates for patients in the clinical trials were 92.1% and 84.22%, respectively, which significantly ($p < 0.05$) exceeded the values of these rates for the historical control group (50.8% and 65.25%). Thus, the use of «Ing-Ras» can significantly improve the treatment results for patients with advanced forms of colorectal and gastric cancer.

Keywords: peritoneal carcinomatosis, RAS-GTPase inhibitor, PIPAC therapy, progression-free survival, safety, KRAS G12C mutation, KRAS, HRAS, NRAS

Funding: the study was conducted with financial support from the Ministry of Health of the Russian Federation, the State Task project EGISU No. 1023021500033-4-3.2.21;3.1.5.

Author contribution: Kulinich TM — research concept and design, material collection and processing, data analysis, manuscript writing; Kukoleva EA — formation of patient groups, a set of clinical material, analysis of results, manuscript writing; Goncharov SV — design of the experimental part of the study, formation of patient groups, a set of clinical material, analysis of results; Kudinova EA, Goncharova OI — analysis of the clinical and experimental research results, manuscript writing and editing; Puchkov IA, Kaminsky VV — formation of patient groups, analysis of results, manuscript writing and editing; Bozhenko VK — research concept and design, manuscript editing and approval.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Russian Scientific Center of Roentgenoradiology (protocol No. 4 dated 28 April 2023). The 2022-1-«Ing-Ras» trial was approved by the Ministry of Health of the Russian Federation (approval No. 177 for the clinical trial dated 30.03.2023). It was conducted in accordance with the ethical principles set out in the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ilya A. Puchkov
Profsoyuznaya, 86, 117997, Moscow, Russia; poutchkov@mail.ru

Received: 23.10.2025 **Accepted:** 21.11.2025 **Published online:** 09.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.065

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/>).

Перитонеальный канцероматоз является одним из наиболее прогностически неблагоприятных осложнений злокачественных новообразований. Его агрессивное течение и резистентность к стандартной системной химиотерапии обусловлены анатомо-физиологическими особенностями брюшины, включая ее ограниченную васкуляризацию и формирование биологических барьеров, что приводит к быстрому прогрессированию и негативному прогнозу, а также препятствует проникновению цитостатиков [1]. Системная химиотерапия демонстрирует ограниченную эффективность. С целью улучшения результатов лечения разрабатываются и внедряются методы локальной лекарственной терапии, такие как PIPAC (внутрибрюшная аэрозольная химиотерапия под давлением) и HIPAC (гипертермическая интраперитонеальная химиотерапия).

Технология PIPAC, предполагающая распыление аэрозоля цитостатика под повышенным давлением углекислоты, обеспечивает равномерное распределение его в брюшной полости даже при имеющемся спаечном процессе после хирургических вмешательств и способствует его дальнейшему проникновению в опухолевые ткани на глубину до 500 мкм, что в 3–5 раз превышает показатели при традиционной интраперитонеальной химиотерапии [2]. Использование данного подхода особенно актуально для лечения опухолей с RAS-мутациями, которые характеризуются повышенной предрасположенностью к диссеминации.

Мутации генов семейства RAS (KRAS, HRAS, NRAS) обнаруживаются в 30–90% случаев аденокарцином желудочно-кишечного тракта, включая случаи развития колоректального рака (40–50%), рака поджелудочной железы (90%) и рака желудка (> 8%) [3, 4]. Онкогенные факторы стабилизируют Ras-белки в GTP-связанном состоянии, блокируя гидролиз GTP до GDP. Это приводит к гиперстимуляции сигнальных путей MAPK/ERK и PI3K/AKT, что усиливает пролиферацию, ангиогенез и метастатический потенциал аденокарциномы [5].

Для преодоления устойчивости опухолей с мутациями в генах RAS необходима разработка высокоселективных ингибиторов, способных точно подавлять активность гиперэкспрессированных Ras-белков. Ингибитор RAS-ГТФазы пептидный препарат «Инг-Рас», разработанный в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России, нарушает образование комплекса Ras-Raf-GTP, подавляя передачу сигналов с помощью каскадного пути MAPK/ERK [6]. Доклинические исследования продемонстрировали, что «Инг-Рас» активно проникает через мембраны клеток, избирательно связываясь с онкогенными Ras-изоформами, и индуцирует апоптоз в клеточных линиях колоректального рака (HT-29) и рака яичников (OVCAR-3) [7].

Для пациентов с перитонеальным канцероматозом предложена комбинированная стратегия включения в стандартную схему лечения препарата «Инг-Рас» при его внутрибрюшинном способе введения с помощью процедуры PIPAC, что обеспечивает высокую внутрибрюшинную концентрацию препарата. Такая стратегия позволит преодолеть ограничения, связанные с применением системной химиотерапии, дополнить ее, увеличивая эффективность лечения.

Комбинация PIPAC-терапии с таргетными ингибиторами RAS, такими как «Инг-Рас», представляет собой перспективный подход в лечении перитонеального канцероматоза. Этот подход объединяет специфическое подавление онкогенных сигнальных путей и оптимизированную доставку препаратов, обеспечивая высокую эффективность при опухолях с RAS-мутациями [8].

В ходе ранее проведенной I фазы клинического исследования препарата «Инг-Рас» по Протоколу № 2022-1-Инг-Рас, которое стало первым клиническим исследованием ингибитора RAS-ГТФазы в Российской Федерации, были успешно выполнены задачи, связанные с оценкой безопасности и переносимости исследуемого препарата [6].

Целью работы было провести предварительную оценку IIa фазы клинического исследования (второй этап протокола клинического исследования № 2022-1-Инг-Рас) эффективности препарата «Инг-Рас» для лечения пациентов с диагнозом опухоли желудочно-кишечного тракта, включая пациентов с перитонеальным канцероматозом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты и дизайн исследования

Исследование проводили в формате проспективного открытого нерандомизированного многоцентрового исследования I–IIa фазы с адаптивным дизайном для изучения безопасности и первичной эффективности, с установлением максимально переносимой дозы препарата на основе ингибитора RAS-ГТФазы («Инг-Рас»).

В рамках этапа II была проведена оценка безопасности дозы 1,8 мг/кг препарата «Инг-Рас», определенной по результатам I этапа, данная доза была одобрена на заседании от 05.12.2023 Независимого комитета по мониторингу данных (НКМД), созданному при ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России [6]. Также была проведена первичная оценка эффективности оптимальной дозы препарата в сравнении с группой исторического контроля. II этап исследования состоял из следующих периодов: скрининг — предварительное обследование пациентов (длительность до 14 дней); в 1-й день исследования пациентам в условиях стационара внутривнутрибрюшинно (методом PIPAC) вводили исследуемый препарат в дозе 1,8 мг/кг. На 8-й день исследования было проведено второе введение препарата тем же методом в дозе 1,8 мг/кг. В последующем пациенты совершили восемь амбулаторных визитов в исследовательский центр, начиная с 21 до 360 дня участия в исследовании. На каждом визите проводилась оценка параметров и безопасности и эффективности.

Исследование проходило в период с 19.06.2023 по 25.12.2024. Результаты I фазы исследования были опубликованы ранее [6]. Фаза IIa клинического исследования была проведена на клинической базе ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России. В исследование были включены 35 пациентов с морфологически подтвержденным перитонеальным канцероматозом при раке желудка и толстой кишки, проходивших комбинированную терапию «Инг-Рас» и PIPAC (ITT-популяция). Из них 23 пациента соответствовали протоколу исследования (PP-популяция). Эффективность оценивали по критериям RECIST 1.1, динамике индекса перитонеального канцероматоза (PCI). Оценку безопасности проводили в соответствии с общепринятой шкалой Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) версии 5.0. Связь нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ) с исследуемым препаратом определяли на основании клинической оценки исследователя. Медианная продолжительность наблюдения составила 388 дней. Количество пациентов для оценки безопасности и первичной оценки эффективности препарата было установлено в соответствии с рекомендациями по объему

выборки для ранних фаз разработки лекарственных препаратов [9]. Анализ эффективности был проведен в отношении всей популяции пациентов, включенных в исследование (ITT, intention-to-treat) ($n = 35$).

Критерии включения: наличие хирургического вмешательства по поводу одного из состояний, перечисленных ниже.

– Резектабельный рак желудка, имеющий признаки прорастания в серозную оболочку, (T3) с наличием опухолевых клеток при исследовании перитонеального смыва по данным цитологического/иммуноцитохимического исследования и/или имеющий признаки инвазии в соседние органы (T4) по данным предоперационного обследования и/или интраоперационной ревизии, либо после проведенного радикального хирургического лечения с гистологически подтвержденным наличием региональных метастазов (N+).

– Резектабельный рак ободочной кишки, имеющий признаки прорастания серозной оболочки (T3) и/или инвазии в соседние органы (T4) по данным предоперационного обследования и/или интраоперационной ревизии.

– Резектабельный рак ободочной кишки после проведенного радикального хирургического лечения с гистологически подтвержденным наличием региональных метастазов (N+).

– Резектабельный рак прямой кишки, имеющий признаки инвазии мезоректальной фасции и/или наличия метастатических лимфоузлов в мезоректуме по данным предоперационного обследования.

– Пациенты после хирургического лечения рака прямой кишки, имеющие критерии качества выполненной тотальной мезоректумэктомии (TME) по P. Quirke как удовлетворительное (grade 2), так и неудовлетворительное (grade 1) по данным морфологического исследования удаленного препарата.

– Пациенты с прогрессированием ранее радикально пролеченного рака желудка или колоректального рака в виде изолированного перитонеального канцероматоза.

Критерии исключения: наличие системных экстраперитонеальных метастазов, в том числе метастазов в центральной нервной системе, и/или карциноматозного менингита, а также наличие любой другой злокачественной опухоли, за исключением радикально пролеченного базальноклеточного рака, рака шейки матки *in situ*, в настоящее время либо в течение 5 лет до включения в исследование.

На основании публикаций, представленных в открытом доступе, была сформирована группа исторического контроля, в которую входили пациенты с диагностированными опухолями желудочно-кишечного тракта, имеющие высокий риск возникновения канцероматоза после оперативного вмешательства и пациенты с метастатическими формами, включая канцероматоз брюшины. Дополнительная ретроспективная группа была сформирована на основании базы результатов прослеживаемости пациентов с диагнозами рак желудка и колоректальный рак ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России [10]. Всего база содержит данные о ходе течения заболевания 1423 пациентов, 449 пациентов с диагнозом рак желудка, медиана наблюдения для данных пациентов составляет 27,7 месяцев, прогрессирование зафиксировано в 42,24% случаев и средний срок наступления рецидива составляет 18,7 месяцев с даты оперативного вмешательства. Пациентов, включенных в базу, с диагнозом колоректальный рак — 974, медиана наблюдения — 41,15 месяцев, рецидив

зафиксирован в 29,72% случаев с медианой наступления рецидива, составляющей 20,04 месяца.

Оценка безопасности

Оценка безопасности включала анализ результатов оценки жизненно важных показателей, данных физикального осмотра, результаты лабораторных и инструментальных исследований. Оценка общего состояния пациента проводили по шкале Восточной объединенной онкологической группы (ECOG) [11].

Оценка прогрессирования заболевания

Оценку прогрессирования проводили на основании целевых-измеряемых и отобранных для контроля очагов и нецелевых очагов с помощью рентгенологических критериев и критериев по RECIST 1.1 [12].

Также проводили оценку индекса перитонеального канцероматоза (ИПК) (Peritoneal Cancer Index (PCI)) в соответствии с методикой, описанной в литературе [13].

Продолжительность исследования по протоколу на этапе IIa составила 388 дней (включая 14 дней скрининга).

Время выживаемости без прогрессирования (PFS) определяли как время от даты хирургического вмешательства до даты прогрессирования, смерти или последнего контакта с пациентом. Прогрессирование заболевания определяли в соответствии с критериями RECIST 1.1 на основе комплексной оценки ответа, проведенной во время текущего визита.

Оценка эффективности

Анализ эффективности препарата «Инг-Рас» проводили в отношении следующих показателей.

– Уровень общей выживаемости (OS) (доля пациентов, выживших в течение года). Общую выживаемость определяли как время от даты проведения хирургического вмешательства по поводу основного заболевания до даты смерти или документально подтвержденного последнего визита в исследовательский центр.

– Уровень выживаемости без прогрессирования (PFS) (доля пациентов, у которых не наступило прогрессирование заболевания в течение года). Выживаемость без прогрессирования определяли как время от даты проведения хирургического вмешательства до даты задокументированного факта прогрессирования заболевания (в соответствии с критериями RECIST 1.1) или смерти (от любой причины).

– Медиана выживаемости без прогрессирования (mPFS) (период времени, в течение которого прогрессирование заболевания наступит у 50% пациентов).

– Динамика индекса перитонеального канцероматоза (ИПК). Была проведена сравнительная оценка эффективности метода с данными исторического контроля. В качестве популяции исторического контроля использовали данные нескольких статей, отражающих результаты лечения и наблюдения за ходом заболевания у пациентов с распространенными формами рака желудка и колоректального рака [14–22].

Статистические методы

Анализ данных был выполнен в программе R-Studio версии 2023.06.1 с использованием языка R версии

4.2.2. Статистический анализ базировался на данных всех пациентов, включенных в исследование, в рамках предварительно установленных аналитических когорт.

Непрерывные (количественные) данные представлены в виде количества наблюдений, среднего арифметического, 95% доверительного интервала (ДИ) для среднего (если не указано иное), стандартного отклонения, медианы, межквартильного размаха, минимума и максимума. Порядковые, категориальные и качественные данные представлены в виде абсолютных частот (количества наблюдений), относительных частот (процентов) и 95% ДИ (если не указано иное). Оценку выживаемости проводили по методу Каплана–Мейера [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка безопасности

Оценка безопасности была проведена на популяции ИТТ по частоте, типу, связи с введением исследуемого препарата и тяжести нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ) (в том числе клинически значимых отклонений лабораторных параметров и результатов инструментальных обследований). Оценку безопасности проводили также по частоте НЯ, связанных с процедурой PIPAC (для которых связь с процедурой была классифицирована как «определенная» или «вероятная»). Количество пациентов, включенных в оценку безопасности на этапе IIa, составило 35 субъектов. В ходе выполнения IIa фазы исследования было зарегистрировано 276 НЯ у всех 35 пациентов в популяции безопасности. Среди всех 276 зарегистрированных нежелательных явлений 265 НЯ (96,01%) были легкой степени тяжести и 11 НЯ (3,99%) — умеренной. В ходе исследования были зарегистрированы следующие НЯ и СНЯ. В группе PP ($n = 23$) зарегистрировано пять случаев НЯ, из них два случая (8,7%) степени 3 (повышение АЛТ/АСТ), связанные с препаратом, у пациентов с раком желудка. В группе ИТТ ($n = 35$) было зарегистрировано 12 случаев НЯ, из них три случая (8,5%) степени 3 (повышение АЛТ/АСТ) и один случай (2,8%) степени 4 (панкреатит), также связанные с препаратом. Среди наиболее частых НЯ — тошнота (15% в ИТТ, 10% в PP), слабость (12% в ИТТ, 8% в PP) и боли в животе (10% в ИТТ, 5% в PP). Серьезных нежелательных явлений, приведших к отмене терапии, не было. Все НЯ были купированы симптоматической терапией.

В ходе выполнения II этапа исследования было зарегистрировано три СНЯ. Таким образом, частота регистрации СНЯ составила 1,09% (3/276) среди всех НЯ. Связь всех СНЯ с применением исследуемого препарата и с проводимой процедурой PIPAC была расценена как «сомнительная». Анализ всех зарегистрированных НЯ в ходе IIa фазы показал, что ни одно из них не имело достоверной связи с исследуемым препаратом или процедурой исследования (связь была оценена как «сомнительная» по классификации ВОЗ). Также не было установлено связи зарегистрированных изменений лабораторных и жизненно-важных показателей с приемом исследуемого препарата.

Таким образом, терапия исследуемым препаратом «Инг-Рас» у пациентов с диагнозом опухоли желудочно-кишечного тракта, включая пациентов с перитонеальным канцероматозом, была хорошо переносима пациентами, обладала благоприятным профилем безопасности и высоким соотношением польза–риск.

Оценка эффективности

Уровень общей выживаемости (OS)

Показатель одногодичной OS в популяции пациентов клинического исследования составил 92,1%. По данным официальных статистических отчетов, в РФ летальность в течение 12 месяцев с даты постановки диагноза для пациентов с диагнозом «колоректальный рак» составляет 19,6%; для пациентов с диагнозом «рак желудка» — 40,0% [14]. Усредненный показатель общей выживаемости в России в 2023 г. пациентов с диагнозами рак желудка и колоректальный рак составляет 70,2%. По данным публикаций [15–16], медианная выживаемость в течение года группы исторического контроля составляет 50,8% [95% ДИ: 33,77–67,83%].

В проведенном клиническом исследовании фазы IIa OS пациентов в течение года составила 92,1%, что практически в 2 раза превышает показатель выживаемости в течение года группы исторического контроля и на 42,45% — официальные статистические данные РФ.

Уровень и медиана одногодичной выживаемости без прогрессирования (PFS)

У двоих пациентов (5,7%) не было данных общей оценки ответа по RECIST 1.1 в связи с выбыванием из исследования до проведения визита 3.

За время исследования было зафиксировано девять случаев прогрессирования основного заболевания. Выживаемость без прогрессирования в течение года после проведенного оперативного вмешательства составила 84,22% [72,42–97,95%].

С учетом условий протокола клинического исследования, особенностей препарата «Инг-Рас» и популяции пациентов, включенных в исследование, для формирования группы исторического контроля был проведен подбор публикаций, включающих сведения о частоте возникновения рецидивов у пациентов с диагнозами рак желудка и колоректальный рак распространенных стадий с высоким риском канцероматоза и сроками наблюдения в исследовании не менее 12 месяцев [17–22]. Анализ сведений, представленных в открытом доступе, позволил определить ряд показателей для отдельных нозологий. Так, согласно публикациям, посвященным исследованиям рака желудка стадий III–IV показатель одногодичной PFS не превышает 65% [17, 18], mPFS находится в пределах от 0,9 месяцев до 7,0 месяцев [21]. Анализ данных открытых источников, в которых представлены результаты лечения пациентов с диагнозом «метастатический колоректальный рак» показал, что в зависимости от варианта лечения mPFS составляет от 5,5 до 12,3 месяцев [22].

Однако имеющиеся в открытых источниках данные о результатах лечения и наблюдения пациентов соответствующих групп не позволили нам провести необходимый статистический анализ и получить достоверные результаты. В связи с чем для дальнейшей оценки результатов первичной эффективности препарата «Инг-Рас» и получения статистически достоверных сведений была использована база результатов прослеживаемости пациентов с диагнозами рак желудка и колоректальный рак ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России [10].

В целях сопоставления пациентов, включенных в клиническое исследование 2022-1-Инг-Рас, и пациентов базы ФГБУ РНЦРР была проведена процедура цензурирования

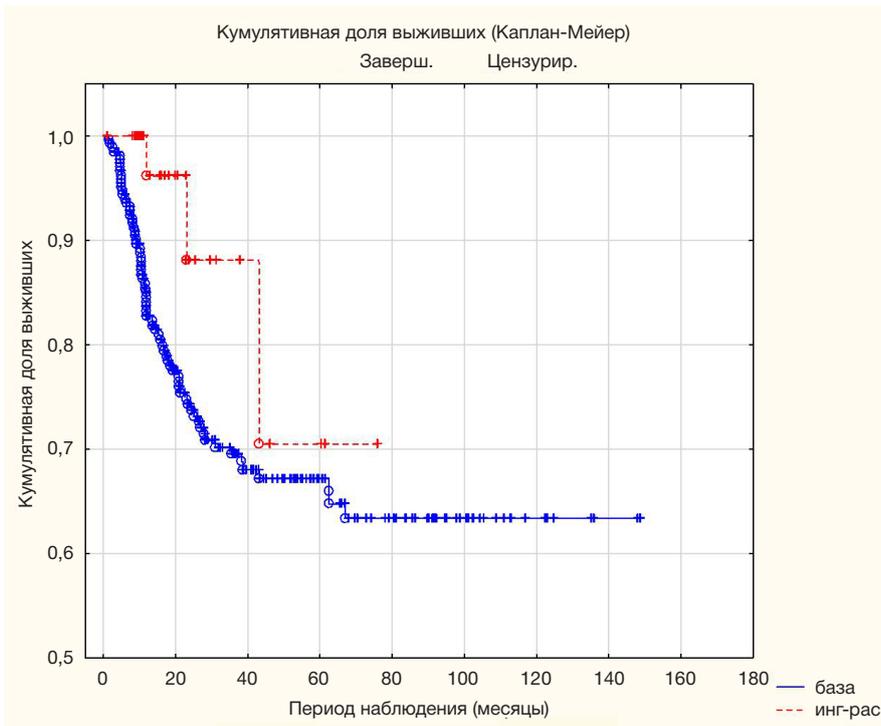


Рис. Сравнение безрецидивной выживаемости (PFS) в группах пациентов протокола клинического исследования 2022-1-Инг-Рас и группе пациентов базы ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России при сроке наблюдения 12 лет

базы и подобраны пациенты, наиболее близко по критериям пола, возраста, стадии заболевания и срокам наблюдения соответствующие пациентам клинического исследования. Личные данные пациентов контрольной группы были полностью заслеплены для участников исследовательской группы, проводивших ее создание и анализ данных.

Предварительную PFS определяли от даты проведения хирургического вмешательства (даты включения пациента в исследование, или даты начала наблюдения за пациентом, в случае контрольной группы) до даты смерти пациента или даты задокументированного факта наступления рецидива или прогрессирования заболевания (в соответствии с критериями RECIST 1.1). Анализ mPFS, проведенный с помощью метода Каплана–Мейера и позволяющий оценить вероятность наступления события (рецидива), при заданном сроке наблюдения в 12 лет представлен на рисунке.

Достоверность различий PFS между группами была доказана с помощью нескольких статистических методов/критериев: F-критерий Кокса (T1 = 65,99039; T2 = 12,00962; F(6, 148) = 4,489096; $p = 0,00033$); критерий Гехана–Уилкоксона (WW = -1519; сумма = 3881Е3; Дисперсия = 4602Е2; статистический критерий = -2,23850; $p = 0,02519$); критерий Кокса–Ментела (I = 7,348708; U = -5,37040; статистический критерий = -1,98108; $p = 0,04758$).

Проведенный анализ позволил сделать вывод о тенденциях увеличения времени безрецидивной выживаемости (PFS) в

исследуемой группе по сравнению с группой исторического контроля, а включение препарата «Инг-Рас» в схему лечения позволяет улучшить результат лечения пациентов с диагнозами рак желудка и колоректальный рак III–IV стадий.

Динамика индекса перитонеального канцероматоза

Сравнительный анализ индекса перитонеального канцероматоза (ИПК) в динамике лечения для популяции ИТТ представлен в таблице.

Различия в оценке ИПК между визитами были оценены с помощью теста Фридмана. Полученное p -значение, равное 0,2484, не позволяет сделать вывод о различиях в ИПК между каждой парой визитов. Сравнение ИПК с показателями ИПК исторического контроля оказалось неприменимо в связи с отсутствием или недостаточностью данных группы сравнения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках IIa фазы клинического исследования была проведена первичная оценка эффективности препарата «Инг-Рас» (пептидный ингибитор Ras-ГТФазы) при двукратном интраперитонеальном введении в дозе 1,8 мг/кг с интервалом 7 дней пациентам с диагнозом опухоли

Таблица. Динамика индекса перитонеального канцероматоза в популяции ИТТ

Показатель	Визит	n	Med	Mean	95% CI	SD	min	max	Q1	Q3	IQR
ИПК, общий балл	Скрининг	35	0	2,09	[0,23–3,95]	5,41	0	22	0	0	0
	Визит 3, День 28 (±1)	33	0	2,24	[0,09–4,39]	6,06	0	24	0	0	0
	Визит 6, День 180 (±14)	27	0	1,63	[-0,63–3,89]	5,71	0	25	0	0	0
	Визит 7, День 270 (±14)	27	0	0,93	[-0,48–2,33]	3,56	0	17	0	0	0
	Визит 8, День 360 (±14)	12	0	1,42	[-1,7–4,53]	4,91	0	17	0	0	0
	Завершение исследования	26	0	0,65	[-0,69–2]	3,33	0	17	0	0	0

желудочно-кишечного тракта, включая пациентов с перитонеальным канцероматозом.

Было показано, что OS в течение года составила 100%, что практически в 2 раза превышает показатель выживаемости в течение года группы исторического контроля [15, 16] и на 42,45% превышает официальные статистические данные РФ [14].

Выживаемость без прогрессирования в течение года в популяции PP и ITT составила 100% и 84,22% соответственно. Медианная PFS для обеих популяций составила 4,45 лет.

Анализ зарегистрированных нежелательных явлений, выявленных в ходе IIa фазы исследования, показал, что ни одно из них не имело достоверной связи с исследуемым препаратом или процедурой исследования (связь была оценена как «сомнительная»).

Применение препарата «Инг-Рас» у пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта, включая случаи перитонеального канцероматоза, не сопровождалось развитием тяжелых побочных реакций, характеризовалось низкой частотой нежелательных эффектов и продемонстрировало оптимальное соотношение польза–риск. Данные подтверждают его перспективность для дальнейшего изучения в клинических исследованиях IIb–III фазы.

На сегодняшний день лишь два ингибитора Ras-ГТФазы одобрены для применения в клинической практике: Сотарасиб и Адаграсиб. Оба препарата селективно ингибируют мутацию KRAS G12C, что представляет собой важное, но узкоспецифичное достижение в области прецизионной онкологии. Сотарасиб (AMG-510), первый ковалентный ингибитор, направленный на KRAS(G12C)-позитивный немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) [22], получил ускоренное одобрение FDA в мае 2021 г. по результатам исследования CodeBreak 100 [24]. А уже в июле 2023 г. препарат под торговым названием Лумикрас® был зарегистрирован в России. В клинических испытаниях Сотарасиб при пероральном применении в дозе 960 мг один раз в сутки продемонстрировал эффективность у 37,1% пациентов со средней PFS, составившей 6,8 месяцев [25].

Адаграсиб (MRTX849/Krazati) стал вторым ингибитором [24, 26], получившим первоначальное одобрение FDA в 2022 г. для терапии местно-распространенного или метастатического немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) с мутацией KRAS-G12C [27]. В 2024 г. после получения результатов клинического исследования, показавших значимый противоопухолевый ответ, комбинация Адаграсиба с Цетуксимабом получила статус «прорывной терапии» и ускоренное одобрение FDA для применения у пациентов с местно-распространенным или метастатическим колоректальным раком (КРР), ассоциированным с мутацией KRAS-G12C [27].

Однако, несмотря на высокую клиническую эффективность, при применении обоих препаратов наблюдаются значительные побочные эффекты. В частности, Сотарасиб может вызывать гепатотоксичность, включая повышение уровней печеночных ферментов АЛТ/АСТ с появлением тяжелых случаев у 3% пациентов и критическими нарушениями (степень 3/4) у 6% и с последующим прекращением лечения. Среди тяжелых осложнений (у 50% пациентов), в том числе в ходе постмаркетинговых наблюдений, зафиксированы пневмония (8%), гепатотоксичность (3%), диарея (2%), а также летальные исходы (3%) и единичные случаи интерстициального поражения легких (0,8%) [28].

Адаграсиб способен вызывать гепатотоксичность, а также провоцировать нарушения ЖКТ, что часто требует коррекции дозировки [29, 30]. К особым рискам применения Адаграсиба относят удлинение интервала QT, повышающее вероятность аритмий при комбинации с другими QT-продолжающими препаратами, а также высокую частоту изменений дозы (52% пациентов) и временной отмены терапии (61%) [30, 31].

Оба ингибитора в целом демонстрируют серьезные токсические эффекты, но применение Адаграсиба связано с более частой коррекцией доз и кардиоваскулярных рисков [31].

Противоопухолевый препарат «Инг-Рас», созданный в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России, продемонстрировал высокую терапевтическую эффективность в ходе проведения клинического исследования I–IIa фазы (2023–2024 гг.) при интраперитонеальном введении пациентам с диагнозом опухоли ЖКТ, в том числе пациентам с осложнениями в виде перитонеального канцероматоза. По результатам проведенного исследования зафиксированы следующие результаты: 100%-я общая выживаемость (OS) через 12 месяцев как в популяции PP и ITT. Медиана выживаемости без прогрессирования (PFS) составила 4,45 года (53,4 месяца), а 84,22% пациентов в группе ITT не имели признаков прогрессирования заболевания [32]. Эти показатели существенно превосходят исторические данные по Сотарасибу и Адаграсибу, которые в исследованиях CodeBreak100 и KRYSTAL-1 при включении пациентов с метастатическим колоректальным раком продемонстрировали медиану выживаемости без прогрессирования 5,6 и 6,5 месяцев соответственно при годовой OS около 45% [33–35].

Механизм действия «Инг-Рас» принципиально отличается от такового у ковалентных ингибиторов KRAS-G12C (Сотарасиб, Адаграсиб). Препарат напрямую ингибирует GTP-активную форму RAS-белков, подавляя сигнальный путь MAPK/ERK вне зависимости от мутационного статуса опухоли [32]. Главное преимущество «Инг-Рас» — высокая терапевтическая эффективность у пациентов с перитонеальным канцероматозом, который традиционно характеризуется резистентностью к системной терапии. Применение метода PIPAC для локального введения препарата обеспечивает максимальную концентрацию в брюшной полости при минимальном системном воздействии, что снижает частоту возникновения НЯ [32, 35].

Применение Сотарасиба и Адаграсиба сопровождается серьезными побочными эффектами. Перспективность применения «Инг-Рас» связана с его способностью преодолевать резистентность опухолевых клеток к препарату, что не характерно для ингибиторов RAS-ГТФазы первого поколения. В то время как у 60% пациентов, проходящих терапию препаратами первого поколения, прогрессирование заболевания развивается в период 6–12 месяцев из-за активации альтернативных сигнальных путей (PI3K/AKT, STAT3), у 84,22% больных, находящихся на лечение «Инг-Рас», не выявлено признаков прогрессирования в течение 4,45 лет. Это может быть связано с одновременным воздействием препарата на микроокружение опухоли помимо прямого ингибирования RAS-ГТФазы [32].

ВЫВОДЫ

В рамках клинических исследований I и IIa фаза препарата «Инг-Рас» при внутрибрюшинном введении методом PIPAC

у пациентов с опухолями ЖКТ (включая перитонеальный канцероматоз) отмечены высокая эффективность, благоприятный профиль безопасности и оптимальное соотношение польза–риск. Данные показывают, что более 80% пациентов не имели прогрессирования заболевания, а безрецидивная выживаемость увеличилась почти на 30%. Эти результаты требуют подтверждения в рандомизированных исследованиях IIb и III фаз. Планируется

проведение исследований IIb фазы для расширения анализа долгосрочной безопасности и эффективности на увеличенной когорте пациентов, а также валидации результатов на независимых группах. Препарат «Инг-Рас» продемонстрировал более высокую эффективность и безопасность по сравнению с зарубежными аналогами ингибиторов Ras-ГТФазы, что позиционирует его как перспективный таргетный противоопухолевой препарат.

Литература

- Coccolini F, Gheza F, Lotti M, Virzì S, Iusco D, Ghermandi C, Melotti R, Baiocchi G, Giulini SM, Ansaloni L, Catena F. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol*. 2013; 19 (41): 6979–94. DOI: 10.3748/wjg.v19.i41.6979.
- Solass W, Kerb R, Mürdter T, Giger-Pabst U, Strumberg D, Tempfer C, et al. Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy. *Ann Surg Oncol*. 2014; 21 (2): 553–9. DOI: 10.1245/s10434-013-3213-1.
- Wu X, Song W, Cheng C, Liu Z, Li X, Cui Y, et al. Small molecular inhibitors for KRAS-mutant cancers. *Front Immunol*. 2023; 14: 1223433. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1223433. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1223433/full>. English.
- Wu L, Rao W, Guo L, Zhang F, Li W, Ying J. Pan-cancer analysis to character the clinicopathological and genomic features of KRAS-mutated patients in China. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2025; 151 (2): 94. DOI: 10.1007/s00432-025-06118-9.
- Wiechmann S, Maisonneuve P, Grebbin BM, Hoffmeister M, Kaulich M, Clevers H, et al. Conformation-specific inhibitors of activated Ras GTPases reveal limited Ras dependency of patient-derived cancer organoids. *J Biol Chem*. 2020; 295 (14): 4526–40. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011025.
- Боженко В. К., Гончаров С. В., Кудинова Е. А., Кулинич Т. М., Куколева Е. А., Филиппов М. С., и др. Оценка безопасности с установлением максимально переносимой дозы ингибитора RAS-ГТФазы («Инг-Рас») для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта: предварительные результаты исследования I фазы. *Альманах клинической медицины*. 2023; 51 (7): 376–96. DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-045.
- Кулинич Т. М., Шишкин А. М., Иванов А. В., Каминский В. В., Боженко В. К. Изучение противоопухолевых свойств пептидной конструкции, включающей интернализируемую последовательность и ингибитор RAS-ГТФазы, в отношении клеток линий рака толстой кишки (HT29) и рака яичника (OAW-42, OVCAR-3). *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России*. 2021; 4 (21). Доступно по ссылке: https://vestnik.mcr.ru/vestnik/v21/docs/kulinich_t4.pdf.
- Yaeger R, Weiss J, Pelster MS, Spira AI, Barve M, Ou SHI, et al. Adagrasib with or without Cetuximab in Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *N Engl J Med*. 2023; 388 (1): 44–54. DOI: 10.1056/NEJMoa2212419.
- Миронов А. Н., редактор. *Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств*. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
- Гончаров С. В., Боженко В. К., Захаренко М. В., Киселева Я. Ю., Чаптыков А. А., Кулинич Т. М., и др. Анализ молекулярных фенотипов эмбрионально-анатомических отделов толстой кишки в нормальной слизистой оболочке и при колоректальном раке. *Альманах клинической медицины*. 2023; 51 (8): 441–55. DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-046.
- Farias ST, Weakley A, Harvey D, Chandler J, Huss O, Mungas D. The Measurement of Everyday Cognition (ECog): Revisions and Updates. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2021; 35 (3): 258–64. DOI: 10.1097/WAD.0000000000000450.
- Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009; 45 (2): 228–47. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
- Рубцова Н. А., Левшакова А. В., Пешков А. О., Хомяков В. М., Уткина А. Б., Сидоров Д. В., и др. Компьютерная и магнитно-резонансная томография в диагностике перитонеального карциноматоза». *Лучевая диагностика и терапия*. 2019; 2 (10): 32–41. DOI: 10.22328/2079-5343-2019-10-2-32-41.
- Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О., редакторы. *Состояние онкологической помощи населению в 2023 году*. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2024; 262 с.
- O’Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, Elez E, Raimbourg J, Gomez-Roca C, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS One*. 2017; 12 (12): e0189848. DOI: 10.1371/journal.pone.0189848. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0189848>. English.
- Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, Garrido M, Salman P, Shen L, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021; 398 (10294): 27–40. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00797-2.
- Sánchez-Hidalgo JM, Rodríguez-Ortiz L, Arjona-Sánchez Á, Rufián-Peña S, Casado-Adam Á, Cosano-Álvarez A, et al. Colorectal peritoneal metastases: Optimal management review. *World J Gastroenterol*. 2019; 25 (27): 3484–502. DOI: 10.3748/wjg.v25.i27.3484.
- Nors J, Iversen LH, Erichsen R, Gotschalck KA, Andersen CL. Incidence of Recurrence and Time to Recurrence in Stage I to III Colorectal Cancer: A Nationwide Danish Cohort Study. *JAMA Oncol*. 2024; 10 (1): 54–62. DOI: 10.1001/jamaoncol.2023.5098.
- Balboa-Barreiro V, Pértega-Díaz S, García-Rodríguez T, González-Martín C, Pardeiro-Pérttega R, Yáñez-González-Doposo L, Seoane-Pillado T. Colorectal cancer recurrence and its impact on survival after curative surgery: An analysis based on multistate models. *Dig Liver Dis*. 2024; 56 (7): 1229–36. DOI: 10.1016/j.dld.2023.11.041.
- Zhang ZT, Xiao WW, Li LR, Wu XJ, Wang QX, Chang H, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy versus neoadjuvant chemotherapy for initially unresectable locally advanced colon cancer: short-term outcomes of an open-label, single-centre, randomised, controlled, phase 3 trial. *EClinicalMedicine*. 2024; 76: 102836. DOI: 10.1016/j.eclinm.2024.102836. Available from: [https://www.clinicaloncologyonline.net/article/S0936-6555\(24\)00488-6/fulltext](https://www.clinicaloncologyonline.net/article/S0936-6555(24)00488-6/fulltext).
- Joshi SS, Maron SB, Catenacci DV. Pembrolizumab for treatment of advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Future Oncol*. 2018; 14 (5): 417–30. DOI: 10.2217/fo-2017-0436.
- Федянин М. Ю., Полянская Е. М., Эльснукеева Х. М., Трякин А. А., Покатаев И. А., Буланов А. А., и др. Метаанализ исследований по сравнению эффективности режимов FOLFOXIRI и FOLFOX или FOLFIRI с таргетной терапией при метастатическом раке толстой кишки с мутацией в гене BRAF. *Медицинский Совет*. 2020; (20): 125–32. DOI: 10.21518/2079-701X-2020-20-125-132.
- Огородникова С. Ю., Константинова Е. Д. Методы визуализации данных в медико-биологических исследованиях. *Траектория исследований — человек, природа, технологии*. 2022; 3 (3): 4–18. Доступно по ссылке: <https://restrajjectory.ru/3-2.pdf>.
- Mahran R, Kapp JN, Valtonen S, Champagne A, Ning J, Gillette W, et al. Beyond KRAS(G12C): Biochemical and Computational

- Characterization of Sotorasib and Adagrasib Binding Specificity and the Critical Role of H95 and Y96. *ACS Chem Biol.* 2024; 19 (10): 2152–64. DOI: 10.1021/acscchembio.4c00315.
25. Miyashita H, Kato S, Hong DS. KRAS G12C inhibitor combination therapies: current evidence and challenge. *Front Oncol.* 2024; 14: 1380584. DOI: 10.3389/fonc.2024.1380584. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1380584/full>.
 26. Prajapati V, Singh AK, Kumar A, Singh H, Pathak P, Grishina M, et al. Structural insights, regulation, and recent advances of RAS inhibitors in the MAPK signaling cascade: a medicinal chemistry perspective. *RSC Med Chem.* 2025; 5 (16): 1923–40. DOI: 10.1039/d4md00923a. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2025/md/d4md00923a>.
 27. Haddad SF, Bouferraa Y, Nair KG. Adagrasib in the treatment of colorectal cancer. *Future Oncol.* 2025; 21 (18): 2275–85. DOI: 10.1080/14796694.2025.2524311. Epub 2025 Jul 6. PMID: 40619745; PMCID: PMC12323406.
 28. Ding Y, Su H, Shu Y, Chen J. Post-marketing safety concerns of sotorasib: A disproportionality analysis based on FDA adverse event reporting system. *Heliyon.* 2024; 10 (9): e30437. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30437. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024064685?via%3Dihub>.
 29. Luo J, Florez N, Donnelly A, Lou Y, Lu K, Ma PC, et al. Adagrasib Treatment After Sotorasib-Related Hepatotoxicity in Patients With KRAS-G12C-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: A Case Series and Literature Review. *JCO Precis Oncol.* 2024; 8: e2300644. DOI: 10.1200/PO.23.00644. Available from: <https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/PO.23.00644>.
 30. Zhang J, Johnson M, Barve M, Bazhenova L, McCarthy M, Schwartz R, et al. Practical Guidance for the Management of Adverse Events in Patients with KRASG12C-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Receiving Adagrasib. *Oncologist.* 2023; 28 (4): 287–96. DOI: 10.1093/oncolo/oyad051.
 31. Jänne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, Heist RS, Ou SHI, Pacheco JM, et al. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRASG12C Mutation. *N Engl J Med.* 2022; 387 (2): 120–31. DOI: 10.1056/NEJMoa2204619.
 32. Кулинич Т. М., Шишкин А. М., Иванов А. В., Каминский В. В., Пучков И. А., Боженко В. К. Разработка инновационных противоопухолевых препаратов на основе таргетных пептидных конструкций. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России* 2024; (2): 59–68. Доступно по ссылке: https://vestnik.rncrr.ru/vypusk/vypusk-ub100/?ELEMENT_ID=172.
 33. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med.* 2021; 384 (25): 2371–81. DOI: 10.1056/NEJMoa2103695.
 34. Parums DV. Editorial: Recent Approval of Sotorasib as the First Targeted Therapy for KRAS G12C-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Med Sci Monit.* 2022; 28: e938746. DOI: 10.12659/MSM.938746. Available from: <https://medscimonit.com/abstract/full/idArt/938746>.
 35. Xia W, Geng Y, Hu W. Peritoneal Metastasis: A Dilemma and Challenge in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2023; 15 (23): 5641. DOI: 10.3390/cancers15235641.

References

1. Cocolini F, Gheza F, Lotti M, Virzì S, Iusco D, Ghermandi C, Melotti R, Baiocchi G, Giulini SM, Ansaloni L, Catena F. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19 (41): 6979–94. DOI: 10.3748/wjg.v19.i41.6979.
2. Solass W, Kerb R, Mürdter T, Giger-Pabst U, Strumberg D, Tempfer C, et al. Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy. *Ann Surg Oncol.* 2014; 21 (2): 553–9. DOI: 10.1245/s10434-013-3213-1.
3. Wu X, Song W, Cheng C, Liu Z, Li X, Cui Y, et al. Small molecular inhibitors for KRAS-mutant cancers. *Front Immunol.* 2023; 14: 1223433. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1223433. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1223433/full>. English.
4. Wu L, Rao W, Guo L, Zhang F, Li W, Ying J. Pan-cancer analysis to character the clinicopathological and genomic features of KRAS-mutated patients in China. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2025; 151 (2): 94. DOI: 10.1007/s00432-025-06118-9.
5. Wiechmann S, Maisonneuve P, Grebbin BM, Hoffmeister M, Kaulich M, Clevers H, et al. Conformation-specific inhibitors of activated Ras GTPases reveal limited Ras dependency of patient-derived cancer organoids. *J Biol Chem.* 2020; 295 (14): 4526–40. DOI: 10.1074/jbc.RA119.011025.
6. Bozhenko VK, Goncharov SV, Kudinova EA, Kulnich TM, Kukoleva EA, Filippov MS, i dr. Ocenka bezopasnosti s ustanovleniem maksimal'no perenosimoy dozy ingibitora RAS-GTFazy («Ing-Ras») dlya lecheniya opuholej zheludochno-kishchechnogo trakta: predvaritel'nye rezul'taty issledovaniya I fazy. Al'manah klinicheskoy mediciny. 2023; 51 (7): 376–96. DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-045. Russian.
7. Kulnich TM, Shishkin AM, Ivanov AV, Kaminskij VV, Bozhenko VK. Izuchenie protivopuholevykh svoystv peptidnoj konstrukcii, vlyuchayushchej internalizuemuyu posledovatel'nost' i ingibitor RAS-GTFazy, v otnoshenii kletok linij raka tolstoj kishki (NT29) i raka yaichnika (OAW-42, OVCAR-3). *Vestnik Rossijskogo nauchnogo centra rentgenoradiologii Minzdrava Rossii.* 2021; 4 (21). Dostupno po ssylke: https://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v21/docs/kulnich_t4.pdf. Russian.
8. Yaeger R, Weiss J, Pelster MS, Spira AI, Barve M, Ou SHI, et al. Adagrasib with or without Cetuximab in Colorectal Cancer with Mutated KRAS G12C. *N Engl J Med.* 2023; 388 (1): 44–54. DOI: 10.1056/NEJMoa2212419.
9. Mironov AN, redaktor. Rukovodstvo po provedeniyu klinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. M.: Grif i K; 2012. 944 s. Russian.
10. Goncharov SV, Bozhenko VK, Zaharenko MV, Kiseleva YaYu, Chaptaykov AA, Kulnich TM, i dr. Analiz molekulyarnykh fenotipov embrional'no-anatomicheskikh odelov tolstoj kishki v normal'noj slizistoj obolochke i pri kolorektal'nom rake. Al'manah klinicheskoy mediciny. 2023; 51 (8): 441–55. DOI: 10.18786/2072-0505-2023-51-046. Russian.
11. Farias ST, Weakley A, Harvey D, Chandler J, Huss O, Mungas D. The Measurement of Everyday Cognition (ECog): Revisions and Updates. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2021; 35 (3): 258–64. DOI: 10.1097/WAD.0000000000000450.
12. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009; 45 (2): 228–47. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
13. Rubcova NA, Levshakova AV, Peshkov AO, Homyakov VM, Utkina AB, Sidorov DV, i dr. Komp'yuternaya i magnitno-rezonansnaya tomografiya v diagnostike peritoneal'nogo karcinomatosa». *Luchevaya diagnostika i terapiya.* 2019; 2 (10): 32–41. DOI: 10.22328/2079-5343-2019-10-2-32-41. Russian.
14. Kaprin AD, Starinskij VV, SHahzadova AO, redaktory. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu v 2023 godu. M.: MNIIO im. P.A. Gercena, 2024; 262 s. Russian.
15. O'Neil BH, Wallmark JM, Lorente D, Elez E, Raimbourg J, Gomez-Roca C, et al. Safety and antitumor activity of the anti-PD-1 antibody pembrolizumab in patients with advanced colorectal carcinoma. *PLoS One.* 2017; 12 (12): e0189848. DOI: 10.1371/journal.pone.0189848. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0189848>. English.
16. Janjigian YY, Shitara K, Moehler M, Garrido M, Salman P, Shen L, et al. First-line nivolumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone for advanced gastric, gastro-oesophageal junction, and oesophageal adenocarcinoma (CheckMate 649): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2021; 398 (10294): 27–40. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00797-2.
17. Sánchez-Hidalgo JM, Rodríguez-Ortiz L, Arjona-Sánchez Á,

- Rufián-Peña S, Casado-Adam Á, Cosano-Álvarez A, et al. Colorectal peritoneal metastases: Optimal management review. *World J Gastroenterol.* 2019; 25 (27): 3484–502. DOI: 10.3748/wjg.v25.i27.3484.
18. Nors J, Iversen LH, Erichsen R, Gotschalck KA, Andersen CL. Incidence of Recurrence and Time to Recurrence in Stage I to III Colorectal Cancer: A Nationwide Danish Cohort Study. *JAMA Oncol.* 2024; 10 (1): 54–62. DOI: 10.1001/jamaoncol.2023.5098.
 19. Balboa-Barreiro V, Pértega-Díaz S, García-Rodríguez T, González-Martín C, Pardeiro-Pértega R, Yáñez-González-Doposo L, Seoane-Pillado T. Colorectal cancer recurrence and its impact on survival after curative surgery: An analysis based on multistate models. *Dig Liver Dis.* 2024; 56 (7): 1229–36. DOI: 10.1016/j.dld.2023.11.041.
 20. Zhang ZT, Xiao WW, Li LR, Wu XJ, Wang QX, Chang H, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy versus neoadjuvant chemotherapy for initially unresectable locally advanced colon cancer: short-term outcomes of an open-label, single-centre, randomised, controlled, phase 3 trial. *EClinicalMedicine.* 2024; 76: 102836. DOI: 10.1016/j.eclinm.2024.102836. Available from: [https://www.clinicaloncolgyonline.net/article/S0936-6555\(24\)00488-6/fulltext](https://www.clinicaloncolgyonline.net/article/S0936-6555(24)00488-6/fulltext).
 21. Joshi SS, Maron SB, Catenacci DV. Pembrolizumab for treatment of advanced gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Future Oncol.* 2018; 14 (5): 417–30. DOI: 10.2217/fon-2017-0436.
 22. Fedyanin MYu, Polyanskaya EM, Elsnukaeva HM, Tryakin AA, Pokataev IA, Bulanov AA, i dr. Metaanaliz issledovanij po sravneniyu effektivnosti rezhimov FOLFOXIRI i FOLFOX ili FOLFIRI s targetnoj terapij pri metastaticheskom rake tolstoj kishki s mutacij v gene BRAF. *Medicinskij Sovet.* 2020; (20): 125–32. DOI: 10.21518/2079-701X-2020-20-125-132. Russian.
 23. Ogorodnikova SYu, Konstantinova ED. Metody vizualizacii dannyh v mediko-biologicheskij issledovaniyah. *Traektoriya issledovanij — chelovek, priroda, tekhnologii.* 2022; 3 (3): 4–18. Dostupno po ssylke: <https://restrajectory.ru/3-2.pdf>. Russian.
 24. Mahran R, Kapp JN, Valtonen S, Champagne A, Ning J, Gillette W, et al. Beyond KRAS(G12C): Biochemical and Computational Characterization of Sotorasib and Adagrasib Binding Specificity and the Critical Role of H95 and Y96. *ACS Chem Biol.* 2024; 19 (10): 2152–64. DOI: 10.1021/acscchembio.4c00315.
 25. Miyashita H, Kato S, Hong DS. KRAS G12C inhibitor combination therapies: current evidence and challenge. *Front Oncol.* 2024; 14: 1380584. DOI: 10.3389/fonc.2024.1380584. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2024.1380584/full>.
 26. Prajapati V, Singh AK, Kumar A, Singh H, Pathak P, Grishina M, et al. Structural insights, regulation, and recent advances of RAS inhibitors in the MAPK signaling cascade: a medicinal chemistry perspective. *RSC Med Chem.* 2025; 5 (16): 1923–40. DOI: 10.1039/d4md00923a. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2025/md/d4md00923a>.
 27. Haddad SF, Bouferraa Y, Nair KG. Adagrasib in the treatment of colorectal cancer. *Future Oncol.* 2025; 21 (18): 2275–85. DOI: 10.1080/14796694.2025.2524311. Epub 2025 Jul 6. PMID: 40619745; PMCID: PMC12323406.
 28. Ding Y, Su H, Shu Y, Chen J. Post-marketing safety concerns of sotorasib: A disproportionality analysis based on FDA adverse event reporting system. *Heliyon.* 2024; 10 (9): e30437. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e30437. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024064685?via%3Dihub>.
 29. Luo J, Florez N, Donnelly A, Lou Y, Lu K, Ma PC, et al. Adagrasib Treatment After Sotorasib-Related Hepatotoxicity in Patients With KRAS-G12C-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: A Case Series and Literature Review. *JCO Precis Oncol.* 2024; 8: e2300644. DOI: 10.1200/PO.23.00644. Available from: <https://ascopubs.org/doi/pdf/10.1200/PO.23.00644>.
 30. Zhang J, Johnson M, Barve M, Bazhenova L, McCarthy M, Schwartz R, et al. Practical Guidance for the Management of Adverse Events in Patients with KRASG12C-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Receiving Adagrasib. *Oncologist.* 2023; 28 (4): 287–96. DOI: 10.1093/oncolo/oyad051.
 31. Jänne PA, Riely GJ, Gadgeel SM, Heist RS, Ou SHI, Pacheco JM, et al. Adagrasib in Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring a KRASG12C Mutation. *N Engl J Med.* 2022; 387 (2): 120–31. DOI: 10.1056/NEJMoa2204619.
 32. Kulnich TM, Shishkin AM, Ivanov AV, Kaminskij VV, Puchkov IA, Bozhenko VK. Razrabotka innovacionnyh protivopuholevyh preparatov na osnove targetnyh peptidnyh konstrukcij. *Vestnik Rossijskogo nauchnogo centra rentgenoradiologii Minzdrava Rossii* 2024; (2): 59–68. Dostupno po ssylke: https://vestnik.mncr.ru/vypusk/vypusk-ub100/?ELEMENT_ID=172. Russian.
 33. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med.* 2021; 384 (25): 2371–81. DOI: 10.1056/NEJMoa2103695.
 34. Parums DV. Editorial: Recent Approval of Sotorasib as the First Targeted Therapy for KRAS G12C-Mutated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Med Sci Monit.* 2022; 28: e938746. DOI: 10.12659/MSM.938746. Available from: <https://medscimonit.com/abstract/full/idArt/938746>.
 35. Xia W, Geng Y, Hu W. Peritoneal Metastasis: A Dilemma and Challenge in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel).* 2023; 15 (23): 5641. DOI: 10.3390/cancers15235641.

ЭКСПРЕССИЯ РЕЦЕПТОРОВ ХЕМОКИНОВ CXCR4 И CXCR7 В ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е. С. Григорьева¹✉, Л. А. Таширева¹, О. Е. Савельева², М. В. Завьялова¹, Н. В. Чердынцева¹, В. М. Перельмутер¹

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

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Хемокиновые рецепторы CXCR4 и CXCR7 в клетках первичной опухоли связаны с прогрессией опухолевого роста. Цель исследования — изучить экспрессию CXCR4 и CXCR7 в субпопуляциях ЦОК с положительной (EpCAM⁺) и отрицательной (EpCAM⁻) экспрессией EpCAM у пациентов с раком молочной железы (РМЖ), а также оценить их связь с клинико-патологическими параметрами и прогностической значимостью. Анализ белковой экспрессии и транскриптомное профилирование ЦОК, полученных из периферической крови, показали, что CXCR4 и CXCR7 преимущественно экспрессировались в EpCAM⁺ ЦОК, тогда как EpCAM⁻ клетки в основном не имели экспрессии CXCR4 и CXCR7 ($p < 0,001$). Важно, что увеличение количества EpCAM⁻ ЦОК, независимо от экспрессии CXCR4/7, было связано с прогрессированием заболевания в течение шестилетнего периода ($p = 0,0007$). Прогностическое значение показано для EpCAM⁻CXCR4/7⁻ ЦОК, при этом количество, превышающее 1,25 кл./мл периферической крови, предсказывало прогрессирование заболевания с чувствительностью 100% и специфичностью 95,1%. Отдельные субпопуляции ЦОК были дополнительно охарактеризованы по маркерам стволовости и эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), что подчеркивает агрессивный фенотип EpCAM⁻ клеток, проявляющих признаки ЭМП. Транскриптомный анализ EpCAM⁻CXCR4/7⁻ ЦОК выявил повышенную экспрессию генов, участвующих в ферроптозе ($p = 3,315 \times 10^{-7}$) и сигнальных путях андрогенового рецептора ($p = 8,0 \times 10^{-9}$), а также генов, ассоциированных с прогрессированием (*HBB*, *IGLC2* и *IGHM*). Напротив, *MALAT1* был сверхэкспрессирован у пациентов без прогрессирования, что указывает на потенциальную подавляющую метастазирование функцию ($p = 1,52 \times 10^{-2}$). Результаты подчеркивают патогенетическую значимость EpCAM⁻ ЦОК в прогрессировании РМЖ и поддерживают смену парадигмы в исследованиях ЦОК в сторону этой субпопуляции.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, хемокиновые рецепторы, эпителиально-мезенхимальный переход, стволовые клетки, транскриптомика, прогрессирование рака молочной железы

Финансирование: исследование проведено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00135).

Вклад авторов: Е. С. Григорьева, О. Е. Савельева, М. В. Завьялова — сбор и анализ данных, Е. С. Григорьева, Л. А. Таширева — написание и редактирование, В. М. Перельмутер — курирование исследования, Н. В. Чердынцева — финансирование проекта.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Томского национального исследовательского медицинского центра (протокол № 8 от 17 июня 2016 г.), проведено согласно требованиям Хельсинкской декларации. Все участники дали письменное информированное согласие.

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

Статья получена: 24.10.2025 **Статья принята к печати:** 29.11.2025 **Опубликована онлайн:** 08.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.064

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/>).

EXPRESSION OF CHEMOKINE RECEPTORS CXCR4 AND CXCR7 IN CIRCULATING TUMOR CELLS OF BREAST CANCER

Grigoryeva ES¹✉, Tashireva LA¹, Savelieva OE², Zavyalova MV¹, Cherdynitseva NV¹, Perelmuter VM¹

¹ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

² Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia

It is known that chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in primary tumor cells are associated with tumor growth progression; however, the significance of their expression in circulating tumor cells (CTCs) remains insufficiently studied. The objective of this study was to investigate the expression of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in subpopulations of CTCs with positive (EpCAM⁺) and negative (EpCAM⁻) EpCAM expression in breast cancer patients, as well as assessed their correlation with clinicopathological parameters and prognostic relevance. The study methods included protein expression analysis and transcriptome profiling of CTCs obtained from peripheral blood. This study comprehensively characterized CXCR4 and CXCR7 expression across EpCAM⁺ and EpCAM⁻ CTC subsets and assessed their clinical relevance through protein-level detection, transcriptomic profiling, and long-term patient follow-up. CXCR4 and CXCR7 receptors were predominantly expressed in EpCAM⁺ CTCs, whereas EpCAM⁻ cells were largely negative. Importantly, an increased number of EpCAM⁻ CTCs, irrespective of CXCR4/7 status, was associated with disease progression over a six-year period ($p = 0,0007$). Prognostic significance was specifically attributed to EpCAM⁻CXCR4/7⁻ CTCs, with counts exceeding 1.25 cells/ml predicting progression with high sensitivity and specificity. Distinct CTC subpopulations were further characterized by stemness and epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers, underscoring the aggressive phenotype of EpCAM⁻ cells exhibiting EMT traits. Transcriptomic analysis of EpCAM⁻CXCR4/7⁻ CTCs revealed upregulation of genes involved in ferroptosis ($p = 3.315 \times 10^{-7}$) and androgen receptor signaling pathways ($p = 8.0 \times 10^{-9}$), alongside identification of progression-associated genes (*HBB*, *IGLC2*, and *IGHM*). Conversely, *MALAT1* was overexpressed in patients without progression, indicating a potential metastasis-suppressive function ($p = 1.52 \times 10^{-2}$). These findings highlight the pathogenetic importance of EpCAM⁻ CTCs in breast cancer progression and support a paradigm shift in CTC research towards this subpopulation. Further investigations are warranted to elucidate the functional roles of these cells and their utility as prognostic biomarkers.

Keywords: circulating tumor cells, chemokine receptors, epithelial-mesenchymal transition, stemness, transcriptomics, breast cancer progression

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 23-15-00135).

Author contribution: Grigoryeva ES, Savelieva OE, Zavyalova MV — data collection and analysis; Grigoryeva ES, Tashireva LA — writing and editing; Perelmuter VM — research supervision; Cherdynitseva NV — project funding.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Local Ethics Committee of Tomsk National Research Medical Center (17 June 2016, the approval No. 8) and complied with the Declaration of Helsinki. All participants gave written informed consent.

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

Received: 24.10.2025 **Accepted:** 29.11.2025 **Published online:** 08.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.064

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/>).

Рак молочной железы (PMЖ) остается одной из наиболее серьезных проблем современной онкологии из-за своей высокой распространенности, высокой смертности и часто метастазирования. Недавние достижения в области методов жидкостной биопсии открыли новые возможности для разработки подходов, позволяющих точнее прогнозировать клиническое течение заболевания. Среди наиболее перспективных объектов исследования — циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК), представляющие собой опухолевые клетки, отделившиеся от первичной опухоли и циркулирующие в кровотоке. Повышенный уровень ЦОК в периферической крови часто коррелирует с неблагоприятным прогнозом, что делает их ценным инструментом для стратификации пациентов и оптимизации стратегий лечения [1]. Однако клиническое применение ЦОК сталкивается с рядом проблем, включая их низкую концентрацию в крови и технические трудности обнаружения [2]. Большинство исследований ЦОК основаны на методах определения экспрессии EpCAM [3]. Это предпочтение во многом обусловлено доступностью коммерчески сертифицированных систем, предназначенных для обнаружения EpCAM-позитивных ЦОК [4]. Хотя опухолевые клетки, экспрессирующие EpCAM, традиционно считали основными драйверами метастазирования, все больше данных подчеркивает важную роль субпопуляций, не экспрессирующих EpCAM [5]. Потеря экспрессии мембранного EpCAM часто связана с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП) — процессом, при котором эпителиальные клетки теряют полярность и межклеточную адгезию, приобретая мезенхимальные черты, такие как повышенная подвижность и устойчивость к апоптозу [6]. При прогрессировании опухоли ЭМП способствует подвижности опухолевых клеток, их инвазии, интравазации, выживанию в кровотоке и образованию метастазов после экстравазации в отдаленные органы [7]. Следовательно, ЦОК представляют собой гетерогенную популяцию, включающую клетки с различными эпителиальными и мезенхимальными фенотипами, а также свойствами, подобными свойствам стволовых клеток, что может лежать в основе их метастатического потенциала.

В контексте исследования гетерогенности ЦОК значительный интерес представляют хемокиновые рецепторы CXCR4 и CXCR7, активируемые их общим лигандом SDF-1 (CXCL12). Наиболее хорошо изученной функцией оси CXCR4–SDF-1 является опосредование направленной миграции клеток-предшественников костного мозга и иммунных клеток к местам воспаления. Хорошо известно, что CXCR4 и CXCR7 часто сверхэкспрессированы в опухолевых клетках, а их взаимодействие с SDF-1 играет решающую роль в прогрессировании рака и метастазировании [8]. Опухолевые клетки с повышенной экспрессией CXCR4 демонстрируют повышенную пролиферацию, обусловленную активацией сигнальных путей MAPK и PI3K/Akt, в то время как повышенные уровни антиапоптотических белков и сниженная экспрессия рецепторов клеточной гибели способствуют выживанию клеток [9]. Первоначально CXCR7 считали рецептором-ловушкой, который секвестрирует CXCL12, тем самым ослабляя активность CXCR4 [10]. Однако последние данные показывают, что CXCR7 может передавать сигнал через неканонический путь β -аррестина, что приводит к активации внутриклеточных каскадов, включая пути протеинкиназы B (AKT) и JAK/STAT, которые дополнительно стимулируют пролиферацию и миграцию

опухолевых клеток [11]. Согласно литературным данным, высокая экспрессия CXCR4 коррелирует с повышенным риском метастазирования PMЖ в лимфатические узлы и отдаленные органы, а также со снижением безрецидивной и общей выживаемости [12]. Подводя итог, можно сказать, что, хотя паттерны экспрессии CXCR4 и CXCR7 в первичных опухолях молочной железы были подробно описаны, число исследований, изучающих их экспрессию в ЦОК, остается крайне ограниченным.

Целью данного исследования было изучить экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в субпопуляциях ЦОК с положительной (EpCAM⁺) и отрицательной (EpCAM⁻) экспрессией EpCAM у больных PMЖ, а также оценить их связь с клинико-патологическими параметрами и прогностической значимостью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследование включены 65 пациенток с инвазивной протоковой карциномой молочной железы неспецифического типа, проходившие лечение в клинике НИИ онкологии Томского национального исследовательского медицинского центра (табл. 1, 2). Исследование ЦОК выполняли до всех видов лечения. Пациенты получали лечение в полном объеме согласно клиническим рекомендациям Министерства здравоохранения РФ. Период наблюдения составил 6 лет.

Проточная цитометрия

Для выявления ЦОК использовали образцы венозной крови, полученные от больных PMЖ. Клеточные концентраты готовили методом седиментации с последующим сбором слоя лейкоцитов на границе раздела между осадком эритроцитов и отделенной плазмой, а также всей надосадочной жидкости по методу, описанному Р. А. Поспеловой [13].

Образцы для проточной цитометрии готовили следующим образом. Клеточный концентрат промывали добавлением 1 мл раствора CellWASH (BD Biosciences, США) и центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Для лизирования эритроцитов добавляли 500 мкл буфера OptiLyse C (Beckman Coulter, Франция), образцы промывали 2 мл раствора CellWASH в течение 10 мин при 300 g, после чего надосадочную жидкость удаляли. После блокирования неспецифического связывания Fc-рецепторов с помощью раствора для блокирования Human TruStain FcX™ (BioLegend, США) к клеточному концентрату добавляли 5 мкл следующих моноклональных антител: BV570 против человеческого CD45 (клон HI30; Sony Biotechnology, США), BV650 против человеческого CD326 (EpCAM) (клон 9C4; Sony Biotechnology, США), BV510 против человеческого CD44 (клон G44-26; BD Horizon, США), PerCP/Cy5.5 против человеческого CD24 (клон ML5; Sony Biotechnology, США), BV421 против человеческого CXCR4 (клон 12G5; Sony Biotechnology, США), BV421 против человеческого CXCR7 (клон 10D1; BD Biosciences; США) и PE/Cy7 против человеческого N-кадгерин (клон 8C11; Sony Biotechnology, США). Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин.

После инкубации пробы промывали 2 мл раствора CellWASH в течение 10 мин при 300 g, удаляя надосадочную жидкость. Для внутриклеточного окрашивания к каждому неокрашенному и окрашенному образцу добавляли

Таблица 1. Клинико-патологические данные пациентов, вошедших в исследование субпопуляционного состава ЦОК

Параметр		Частота, % (n)
Возраст	≤ 50	26,67% (12/45)
	> 50	73,33% (33/45)
Размер опухоли (сТ)	1	35,56% (16/45)
	2	60,00% (27/45)
	4	4,44% (2/45)
Стадия	IA	28,89% (13/45)
	IIA	33,33% (15/45)
	IIB	33,33% (15/45)
	IIIB	4,44% (2/45)
Вовлеченность лимфоузлов (сN)	0	53,33% (24/45)
	1	46,67% (21/45)
Молекулярно-биологический подтип	Люминальный A	26,67% (12/45)
	Люминальный B (HER2 ⁻)	37,78% (17/45)
	Люминальный B (HER2 ⁺)	20,00% (9/45)
	Тройной негативный	6,67% (3/45)

250 мкл раствора BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, США) с последующей инкубацией в темноте при 4 °С в течение 20 мин. Затем образцы дважды промывали в 1 мл буфера BD Perm/Wash (BD Biosciences, США) путем центрифугирования при 300 г в течение 6 мин. Затем к каждому образцу добавляли 50 мкл буфера BD Perm/Wash и 5 мкл следующих антител: AF647-anti-human CK7/8 (клон CAM5.2; BD Pharmingen, США), AF488-anti-human Snail1 (клон 20C8; eBioscience, США) и AF750-anti-human Vimentin (R&D Systems, США). Образцы инкубировали при 4 °С в течение 20 мин.

Затем каждый образец промывали в 1 мл буфера CellWASH (BD Biosciences; США) центрифугированием при 300 г в течение 6 мин. На заключительном этапе к осадку добавляли 100 мкл буфера для окрашивания клеток (Sony Biotechnology; США) и ресуспендировали образец. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре Novocyte 3000 (ACEA Biosciences; США) с использованием

программы NovoExpress 1.3.0 (ACEA Biosciences; США). Концентрацию циркулирующих клеток рассчитывали на 1 мл крови.

Статистический анализ проводили с использованием пакета Prism 10.4.1 (GraphPad Software; США). Для анализа независимых групп использовали критерий Краскела–Уоллиса, а для анализа двух независимых групп — критерий Манна–Уитни. Для оценки прогностической ценности точности прогноза использовали ROC-анализ. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Транскриптомное секвенирование единичных ЦОК

Для изучения транскриптомного профиля EPCAM⁻ и EPCAM⁺ ЦОК был использован набор данных РНК-секвенирования 20 пациентов с РМЖ (Т1-4N0-3M0, все молекулярные подтипы), полученный в нашем предыдущем

Таблица 2. Клинико-патологические данные пациентов, вошедших в исследование транскрипционного профиля ЦОК

Параметр		Частота, % (n)
Возраст	≤ 50	30,0% (6/20)
	> 50	70,0% (14/20)
Размер опухоли (сТ)	1	5,0% (1/40)
	2	80,0% (15/40)
	3	5,0% (1/20)
	4	5,0% (3/20)
Стадия	I	5,0% (1/20)
	IIA	20,0% (5/20)
	IIB	40,0% (8/20)
	IIIA	15,0% (3/20)
	IIIB	10,0% (2/20)
Вовлеченность лимфоузлов (сN)	0	30,0% (6/20)
	1	70,0% (14/20)
Молекулярно-биологический подтип	Люминальный A	10,0% (2/20)
	Люминальный B (HER2 ⁻)	65,0% (13/20)
	Люминальный B (HER2 ⁺)	10,0% (2/20)
	Тройной негативный (HER2 ⁻)	5,0% (5/20)
	(HER2 ⁺)	10,0% (1/20)

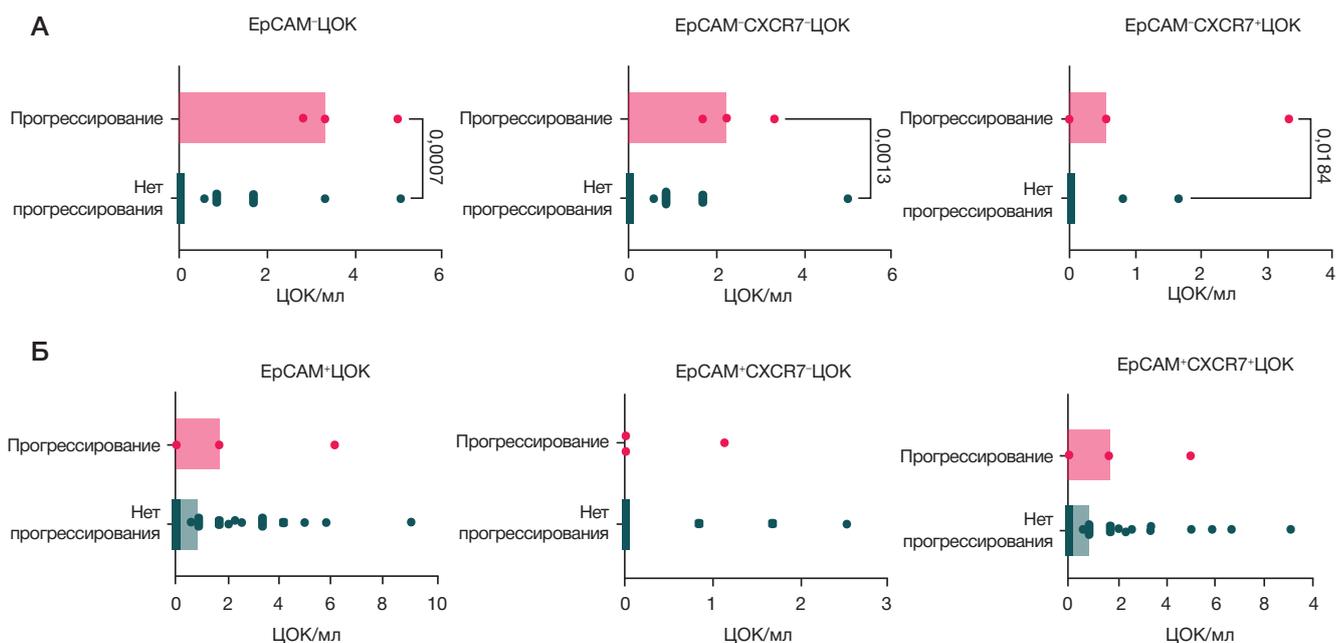


Рис. 1. Количество EpCAM⁻ (А) и EpCAM⁺ (Б) ЦОК в зависимости от экспрессии CXCR4/7 у пациентов с РМЖ с прогрессированием опухоли в течение шестилетнего периода наблюдения

исследовании [14], доступный через BioProject под регистрационным номером PRJNA776403.

Для контроля качества и анализа данных секвенирования РНК отдельных клеток использовали программный пакет Seurat версии 4.0.4 [15]. Дуплеты клеток идентифицировали с помощью DoubletFinder [16] и затем удаляли из каждого набора данных. Была проведена интеграция 20 наборов данных с параметрами по умолчанию. Агрегированные данные прошли предварительную обработку с исключением клеток с числом уникальных признаков менее 200 и процентом митохондрий более 25. Необработанные значения UMI РНК в агрегированных данных были нормализованы, после чего был проведен анализ главных компонент (PCA). Набор данных был визуализирован и исследован с помощью метода равномерного многообразия аппроксимации и проекции (UMAP), нелинейного метода редукции размерности.

Анализ данных пространственной транскриптомики ткани опухоли молочной железы

Набор данных пространственной транскриптомики, созданный в нашем предыдущем исследовании [17] и доступный в базе данных GEO под регистрационным номером GSE242311, был использован для исследования экспрессии генов в EpCAM⁻ и EpCAM⁺ опухолевых клетках в первичной опухоли пяти пациентов с РМЖ (инвазивная карцинома неспецифического типа, люминальные А и В, стадии I-IIA, степень злокачественности 2–3). Данные были отфильтрованы для исключения генов с ненулевой экспрессией менее чем в 10 регионах ткани и регионы ткани с менее чем 200 отфильтрованными генами. Первичные значения были нормализованы с помощью функции SCTransform [18] с параметрами по умолчанию. Затем к нормализованным с помощью SCTransform значениям был применен метод аппроксимации и проекции равномерного многообразия (UMAP) с использованием первых 30 главных компонент, определенных с помощью анализа главных компонент (PCA). Результаты визуализировали с помощью пакета Seurat.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Связь между количеством EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК, экспрессирующих CXCR4 и CXCR7, и клиническими параметрами у пациентов с РМЖ

Количество EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК оценивали в периферической крови пациентов с РМЖ. EpCAM⁺ ЦОК определялись как клетки, экспрессирующие EpCAM, но не экспрессирующие пан-лейкоцитарный антиген CD45, независимо от экспрессии цитоцератинов 7/8. EpCAM⁻ ЦОК определялись как CD45-отрицательные клетки без экспрессии EpCAM, но позитивные по цитоцератинам 7/8. Анализ показал, что количество EpCAM⁺ ЦОК было значительно выше, чем количество EpCAM⁻ ЦОК ($p = 0,0237$). Медиана количества EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК составила 0,00 (0,00–1,25) и 0,83 (0,00–3,32) кл./мл соответственно.

EpCAM⁺ ЦОК демонстрировали значительно более высокую экспрессию хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 по сравнению с EpCAM⁻ ЦОК (25/45 против 6/45; $p < 0,001$). В частности, среди EpCAM⁺ ЦОК преобладали клетки, позитивные по CXCR4/7, тогда как среди EpCAM⁻ ЦОК чаще встречались клетки, негативные по CXCR4/7. Медианное количество CXCR4/7⁺ клеток составило 0,83 (0,00–2,12) кл./мл для EpCAM⁺ ЦОК и 0,00 (0,00–0,00) кл./мл для EpCAM⁻ ЦОК. Напротив, медианное количество CXCR4/7⁻ клеток составило 0,00 (0,00–0,00) кл./мл для EpCAM⁺ ЦОК и 0,00 (0,00–0,83) кл./мл для EpCAM⁻ ЦОК. Более того, количество ЦОК, экспрессирующих CXCR4/7, было значительно выше среди EpCAM⁺ ЦОК по сравнению с EpCAM⁻ ЦОК ($p < 0,001$), с медианными значениями 0,83 (0,00–2,12) кл./мл и 0,00 (0,00–0,00) кл./мл соответственно.

Анализ количества EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК, экспрессирующих CXCR4/7, в зависимости от клинико-патологических параметров не выявил значимых ассоциаций с клиническими параметрами (Приложение, рис. 1А–Г).

В течение шестилетнего периода у трех пациентов наблюдали прогрессирование заболевания: у одного — рецидив опухоли, а у двух — отдаленные метастазы. Эти

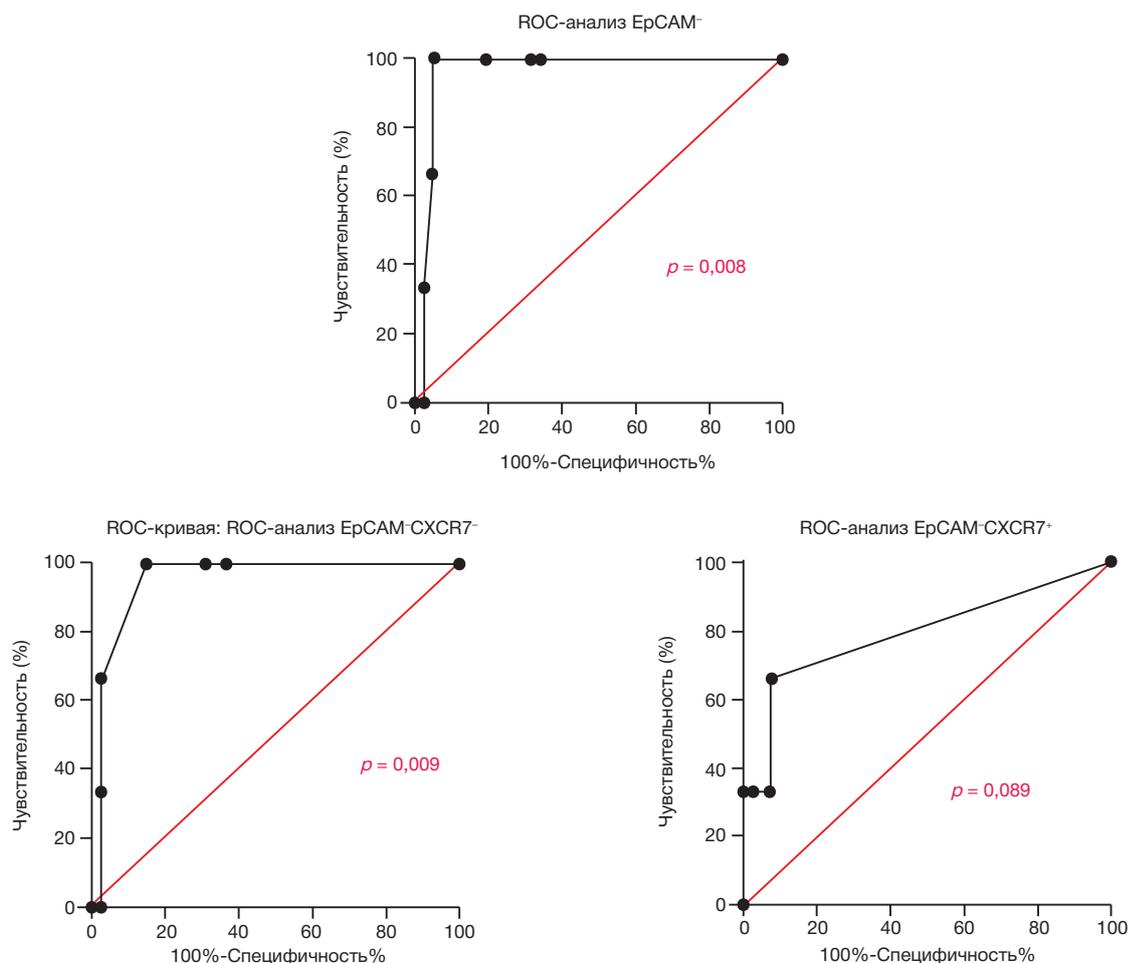


Рис. 2. ROC-анализ EpCAM⁻ ЦОК по экспрессии CXCR4/7 у больных PMЖ с прогрессированием заболевания в течение шестилетнего периода наблюдения

пациенты были отнесены к группе с прогрессированием, остальные — к группе без прогрессирования. Сравнительный анализ количества EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК, экспрессирующих CXCR4 и CXCR7, выявил значительное увеличение общей популяции EpCAM⁻ ЦОК, а также EpCAM⁻CXCR4/7⁺ и EpCAM⁻CXCR4/7⁻ субпопуляций у пациентов с прогрессированием ($p = 0,0007$, $p = 0,0184$ и $p = 0,0013$ соответственно) (рис. 1А). Значимых различий в количестве EpCAM⁺ ЦОК, независимо от экспрессии CXCR4/7, между пациентами с признаками прогрессирования и без них в течение периода наблюдения выявлено не было ($p > 0,05$) (рис. 1Б).

ROC-анализ количества EpCAM⁻ ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7 у пациентов с прогрессированием в течение 6 лет наблюдения продемонстрировал прогностическое значение как параметров EpCAM⁻, так и EpCAM⁻CXCR4/7⁻ (рис. 2). Количество EpCAM⁻ ЦОК $>2,23$ кл./мл периферической крови предсказывало прогрессирование со 100,0% чувствительностью и 95,1% специфичностью (AUC = 0,96, 95% ДИ: 0,91–1,00; $p = 0,008$). Аналогично, количество EpCAM⁻ CXCR4/7⁻ ЦОК $>1,25$ кл./мл предсказывало прогрессирование со 100,0% чувствительностью и 85,7% специфичностью (AUC = 0,96, 95% ДИ: 0,89–1,00; $p = 0,009$). Эти результаты свидетельствуют о том, что популяция EpCAM⁻CXCR4/7⁻ ЦОК имеет прогностическое значение, тогда как клетки EpCAM⁻CXCR4/7⁺ нет (AUC = 0,80, 95% ДИ: 0,47–1,00; $p = 0,089$).

Анализ маркеров стволовых клеток и ЭМП в EpCAM⁻CXCR4/7⁻ ЦОК, ассоциированных с прогрессированием

опухоли, выявил наличие признаков стволовых клеток, основанных на экспрессии маркеров CD44/CD24, CD133 и ALDH1A1. Количество EpCAM⁻CXCR4/7⁻CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1A1⁺ ЦОК было значительно выше у пациентов с прогрессированием в течение периода наблюдения по сравнению с пациентами без прогрессирования ($p = 0,003$). Медиана количества ЦОК с фенотипом CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1A1⁺ составила 0,00 (0,00–0,00) кл./мл у пациентов без прогрессирования и 1,66 (0,00–1,68) кл./мл — у пациентов с прогрессированием. При оценке особенностей ЭМП выявлена экспрессия N-кадгерина и Snail ($p = 0,003$). Медиана числа ЦОК с фенотипом N-cadherin⁺Snail⁺Vimentin⁻ у пациентов без признаков прогрессии и с их наличием составила 0,00 (0,00–0,00) и 2,24 (0,00–4,98) кл./мл соответственно.

Ассоциация экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 с признаками стволовых клеток среди EpCAM⁺ и EpCAM⁻ CTC

Для оценки связи между признаками стволовости и экспрессией хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 были проанализированы частота и количество ЦОК, экспрессирующих маркеры стволовости CD44/CD24, CD133 и ALDH1, среди EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7. Среди EpCAM⁺ ЦОК наибольшая частота наблюдалась для клеток с фенотипом CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1⁺. В частности, частота встречаемости этих клеток составляла 51,1% (23/45) при экспрессии CXCR4/7

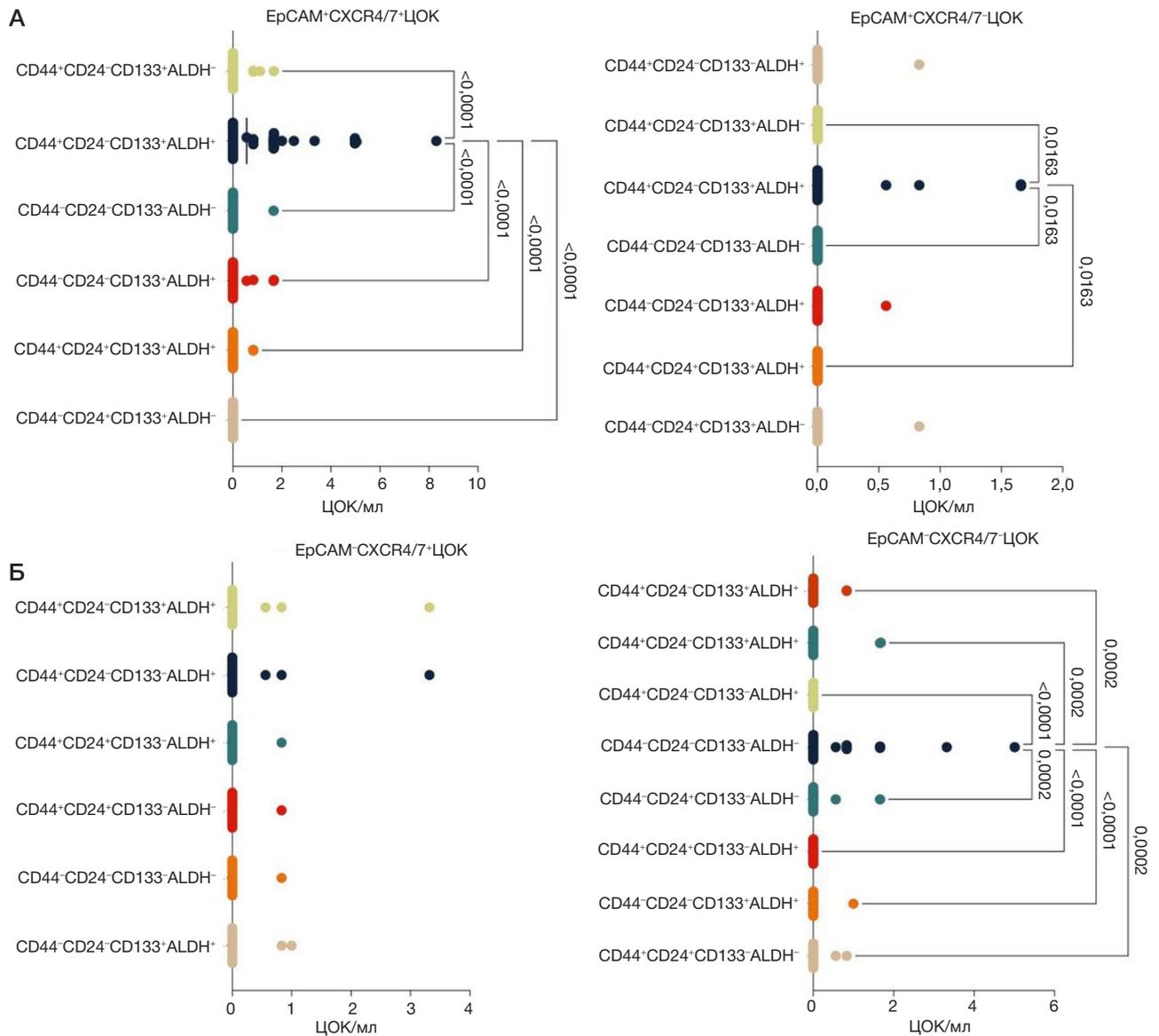


Рис. 3. Количество EpCAM⁺ (А) и EpCAM⁻ (Б) ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7 со стволовыми признаками у пациентов с РМЖ

по сравнению с 11,1% (5/45) в отсутствие CXCR4/7. Таким образом, встречаемость клеток CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1⁺ была значительно выше в EpCAM⁺ ЦОК, экспрессирующих хемокиновые рецепторы CXCR4/7 ($p < 0,0001$). Наибольшее количество клеток также характеризовалось фенотипом CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH⁺, независимо от экспрессии CXCR4/7 (рис. 3А). Количество клеток с этим стволовым фенотипом было выше среди EpCAM⁺CXCR4/7⁺ ЦОК ($p < 0,0001$). Медиана CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH⁺ среди EpCAM⁺CXCR4/7⁺ ЦОК составила 0,56 (0,00–1,67) кл./мл и 0,00 (0,00–0,00) кл./мл среди EpCAM⁺CXCR4/7⁻ ЦОК. Среди EpCAM⁻CXCR4/7⁺ ЦОК частота встречаемости и количество клеток с вариантами стволовости не различались ($p > 0,05$) (рис. 3Б).

Частота встречаемости EpCAM⁻CXCR4/7⁻ ЦОК была крайне низкой. Наиболее распространенным фенотипом среди этих клеток был CD44⁻CD24⁻CD133⁻ALDH⁻ (12 из 45 случаев), в то время как частота всех остальных фенотипов не превышала 2 из 45 ($p = 0,02$). Кроме того, количество клеток CD44⁻CD24⁻CD133⁻ALDH⁻ было значительно выше по сравнению с другими фенотипами, уровни значимости указаны на рисунке выше. Медианное количество клеток с этим фенотипом составило 0,00 (0,00–

–0,70) кл./мл (рис. 3Б). Оценка экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в EpCAM⁺ ЦОК с различными фенотипами стволовых клеток показала, что доля клеток CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH1⁺, экспрессирующих CXCR4/7, значительно выше ($p < 0,0001$) (рис. 4А). Напротив, количество ЦОК с экспрессией CXCR4/7 и без нее достоверно не различалось среди клеток с другими фенотипами стволовых клеток ($p > 0,05$).

Анализ экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в EpCAM⁻ ЦОК с учетом признаков стволовости не выявил значимых различий в экспрессии CXCR4/7 среди ЦОК с признаками стволовости (рис. 4Б). Однако значительно большее количество клеток, лишенных признаков стволовости, характеризующихся фенотипом CD44⁻CD24⁻CD133⁻ALDH⁻, были отрицательными по экспрессии CXCR4/7 ($p = 0,0011$).

Ассоциация экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 с признаками ЭМП в EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК

В EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК оценивали экспрессию раннего маркера ЭМП Snail, который подавляет эпителиальные

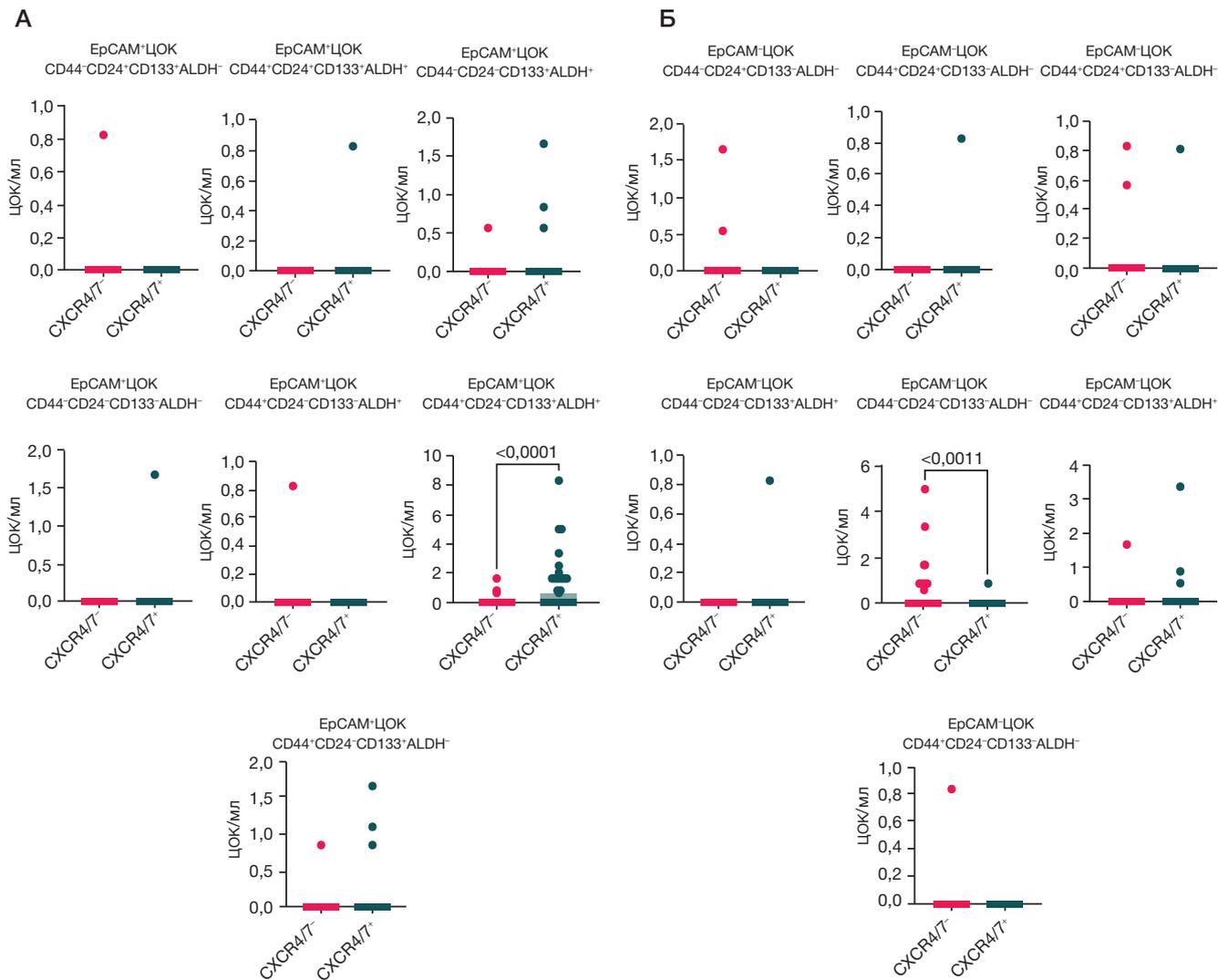


Рис. 4. Сравнение количества $EpCAM^+$ (А) и $EpCAM^-$ (Б) ЦОК с признаками стволовости в зависимости от экспрессии $CXCR4/7$ при РМЖ

маркеры и стимулирует экспрессию мезенхимальных маркеров, а также поздних маркеров ЭМП N-кадгерина и виментина. Среди $EpCAM^+CXCR4/7^+$ ЦОК наибольшая частота наблюдалась в клетках, экспрессирующих поздние маркеры ЭМП N-кадгерин и виментин, что составило 35,6% (16/45). Более того, количество клеток $N-cadherin^+Snail^-vimentin^+$ было достоверно выше, чем у $N-cadherin^+Snail^-vimentin^-$ и $N-cadherin^-Snail^-vimentin^-$ ЦОК ($p = 0,0003$ и $p = 0,0009$ соответственно) (рис. 5А). Напротив, среди $EpCAM^+$ ЦОК, не экспрессирующих $CXCR4/7$, распределение клеток с различными фенотипами ЭМП достоверно не различалось ($p > 0,05$). При этом среди $CXCR4/7^-$ ЦОК практически не встречались клетки с фенотипом $N-cadherin^+Snail^-Vimentin^+$; их количество было выше среди $CXCR4/7^+$ ЦОК ($p < 0,0001$) (рис. 5Б).

Анализ экспрессии ранних и поздних маркеров ЭМП в $EpCAM^-$ ЦОК с учетом экспрессии $CXCR4/7$ не выявил значимых различий ($p > 0,05$) (рис. 6А). Примечательно, что среди $EpCAM^-$ субпопуляции, экспрессирующей $CXCR4/7$, не было обнаружено клеток, коэкспрессирующих все три анализируемых маркера ЭМП.

Среди $EpCAM^-$ ЦОК, лишенных N-кадгерина и экспрессирующих Snail, независимо от статуса виментина, значительно большее количество клеток были отрицательными по экспрессии $CXCR4/7$ ($p = 0,0061$ и $p = 0,0189$ соответственно) (рис. 6Б).

Экспрессия генов $CXCR4$ и $CXCR7$ в $EpCAM^+$ и $EpCAM^-$ ЦОК

В 20 проанализированных образцах пациентов с РМЖ было идентифицировано 239 ЦОК. $EpCAM^-$ ЦОК были определены как клетки, в которых отсутствовала экспрессия генов $PTPRC$ (CD45) и $EpCAM$, но наблюдалась положительная экспрессия генов цитокератина ($KRT7$, $KRT8$ или $KRT18$). Напротив, $EpCAM^+$ ЦОК были охарактеризованы как клетки без экспрессии $PTPRC$ (CD45) и с уровнем экспрессии гена $EpCAM$ выше нуля, независимо от экспрессии цитокератинов. Следовательно, группы $EpCAM^+$ и $EpCAM^-$ ЦОК включали 11 и 228 клеток соответственно. Частота экспрессии генов рецепторов хемокинов SDF-1 — $CXCR4$ или $CXCR7$ — достоверно не различалась между клетками $EpCAM^+$ и $EpCAM^-$ и составляла 54,5% (6/11) и 53,5% (122/228) соответственно.

Анализ дифференциальной экспрессии генов между клетками $EpCAM^+$ с экспрессией $CXCR4/7$ и без нее не выявил значимых различий ($p > 0,05$). Напротив, при сравнении внутри $EpCAM^-$ субпопуляции различия были выявлены. Наиболее сверхэкспрессированные гены в $EpCAM^-CXCR4/7^+$ ЦОК включали $POSTN$ ($p = 6,63 \times 10^{-13}$), $FN1$ ($p = 5,24 \times 10^{-14}$), $COL3A1$ ($p = 1,08 \times 10^{-11}$), VIM ($p = 2,33 \times 10^{-19}$), $S100A6$ ($p = 4,60 \times 10^{-9}$) и $CD74$ ($p = 1,11 \times 10^{-7}$). Активированные сигнальные пути в клетках

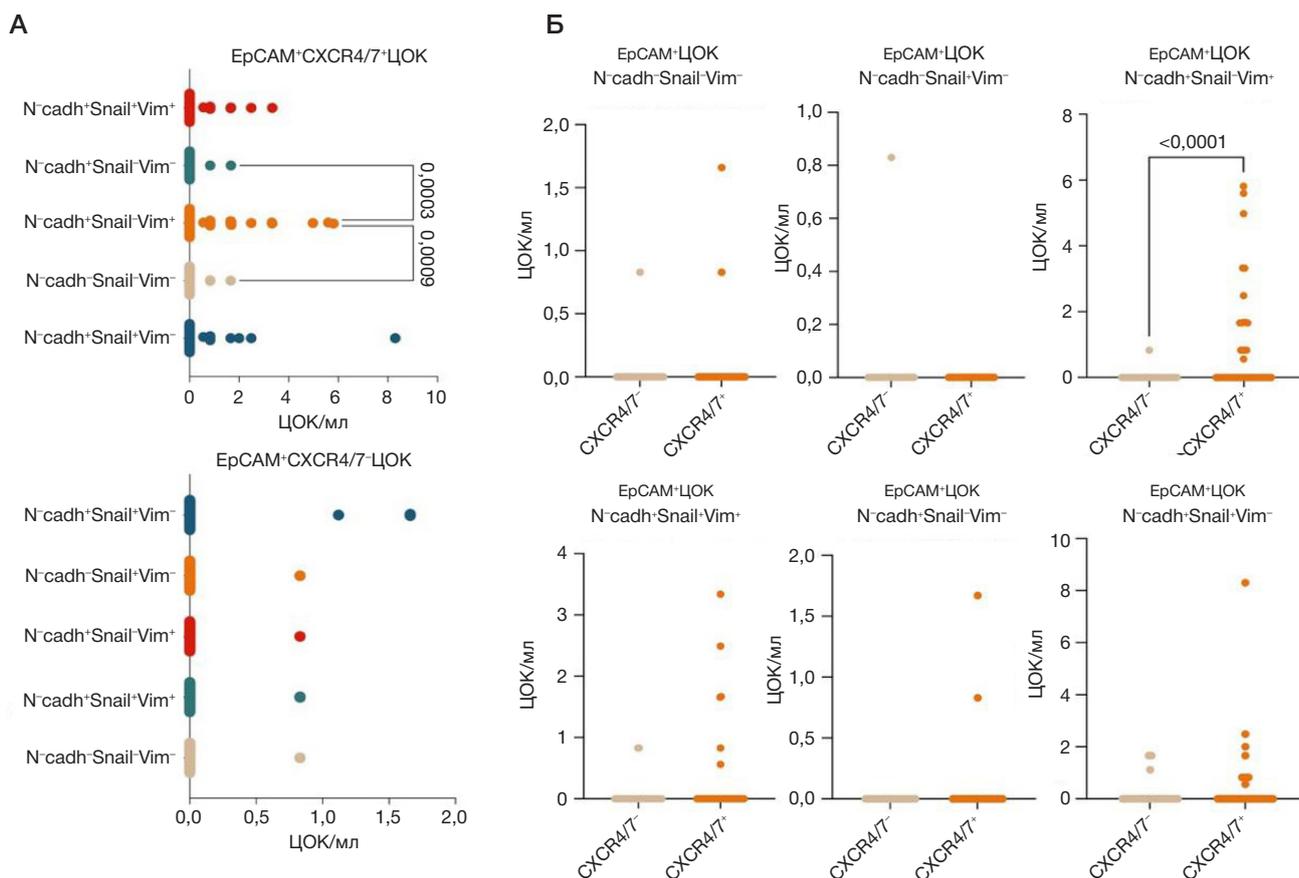


Рис. 5. Количество EPCAM⁺ ЦОК с учетом экспрессии CXCR4/7 с признаками ЭМП у пациентов с РМЖ

EPCAM⁺*CXCR4/7*⁺ показаны на рис. 2 Приложения. Согласно базе данных KEGG 2021 Human, наибольшее количество сверхэкспрессированных генов было связано с метаболизмом рибосом ($p = 2,365 \times 10^{-143}$), тогда как база данных MSigDB Hallmark 2020 определила путь Muc Targets V1 как наиболее активированный ($p = 7,59 \times 10^{-11}$) (Приложение, рис. 2А).

В популяции *EPCAM*⁺*CXCR4/7*⁻ ЦОК наблюдалась повышенная экспрессия множества генов, причем наиболее выражена сверхэкспрессия была у *PF4* ($p = 1,33 \times 10^{-24}$), *PPBP* ($p = 5,40 \times 10^{-23}$) и *TUBB1* ($p = 1,62 \times 10^{-20}$) и др. Согласно базе данных KEGG 2021 Human, наибольшая группа генов с повышенной экспрессией была связана с путем ферроптоза ($p = 3,315 \times 10^{-7}$), в то время как база данных MSigDB Hallmark 2020 выявила значительное обогащение сигнального пути андрогеновых рецепторов ($p = 8,0 \times 10^{-5}$) (Приложение, рис. 2Б). Сравнение профилей транскрипции *EPCAM*⁺ и *EPCAM*⁻ ЦОК, экспрессирующих *CXCR4/7*, не выявило значимых различий ($p > 0,05$).

В период наблюдения, начавшегося в 2020 г., прогрессирование заболевания наблюдалось у четырех из 20 пациентов. У троих из них развились метастазы в отдаленные органы, а у одного пациента — в регионарные лимфатические узлы. Распределение субпопуляций ЦОК в образцах, полученных от отдельных пациентов, представлено в Приложении, табл. 1.

Значимых различий в частоте и количестве *EPCAM*⁺ и *EPCAM*⁻ ЦОК, экспрессирующих гены хемокиновых рецепторов *CXCR4/7*, между пациентами с различными результатами лечения в течение шестилетнего периода наблюдения выявлено не было ($p > 0,05$). Кроме того, был проведен дифференциальный анализ экспрессии генов в *EPCAM*⁺*CXCR4/7*⁻ ЦОК у пациентов с прогрессированием

заболевания и без него в течение периода наблюдения. В группе пациентов с прогрессированием опухоли экспрессия трех генов была значительно повышена: *HBB* ($p = 1,34 \times 10^{-5}$), *IGLC2* ($p = 7,49 \times 10^{-6}$) и *IGHM* ($p = 1,05 \times 10^{-5}$). Напротив, среди пациентов без прогрессирования была значительно повышена экспрессия только гена *MALAT1* ($p = 1,52 \times 10^{-2}$).

Пространственный транскриптомный анализ *EPCAM*⁺ и *EPCAM*⁻ опухолевых клеток в зависимости от экспрессии генов *CXCR4* и *CXCR7*

Была проведена ручная аннотация регионов в пяти образцах РМЖ для выявления регионов, содержащих опухолевые клетки. Регионы, состоящие исключительно из стромальных клеток, или регионы, в которых количество стромальных клеток превышало количество опухолевых, были исключены из анализа. Впоследствии с помощью инструмента Gene Filter все регионы были разделены на две группы в зависимости от уровня экспрессии гена *EPCAM*. Участки с экспрессией *EPCAM* ≤ 2 единиц были обозначены как *EPCAM*⁻, пятна с экспрессией *EPCAM* ≥ 3 единиц были классифицированы как *EPCAM*⁺. В каждой группе *EPCAM*⁺ и *EPCAM*⁻ регионы оценивали экспрессию генов хемокиновых рецепторов *CXCR4* и *CXCR7*, что привело к выявлению кластеров, включающих регионы, отрицательные по обоим генам (*CXCR4/7*⁻), и кластеров, содержащих регионы, экспрессирующие по крайней мере один из двух генов (*CXCR4/7*⁺). Транскрипционные профили регионов *EPCAM*⁺, экспрессирующих *CXCR4* и/или *CXCR7*, сравнивали с профилями регионов, не экспрессирующих *CXCR4/7*. Регионы *EPCAM*⁺*CXCR4/7*⁺ демонстрировали значительное количество дифференциально

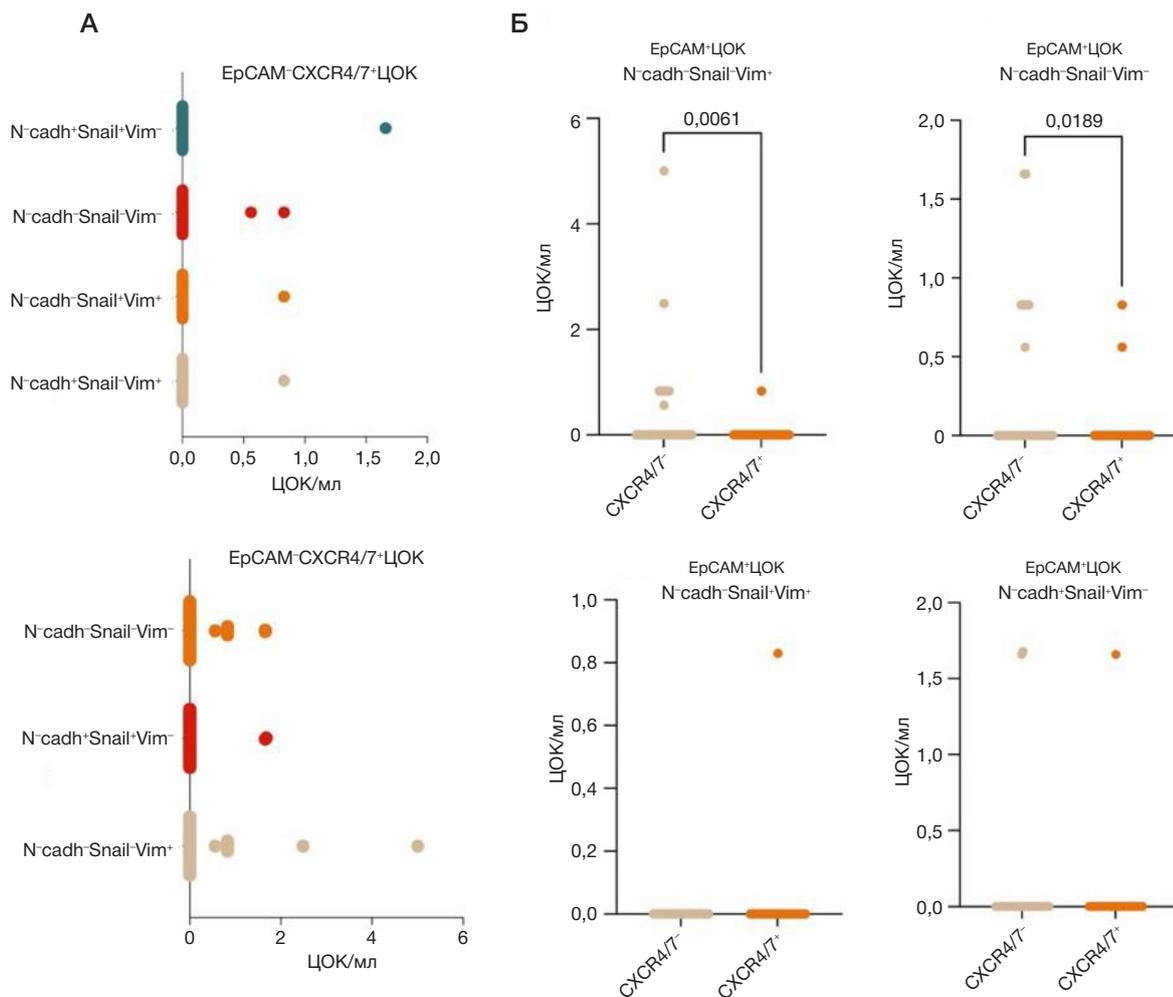


Рис. 6. Количество EpCAM-CTC с учетом экспрессии CXCR4/7 с признаками ЭМП у пациентов с РМЖ

экспрессируемых генов, большинство генов с повышенной экспрессией были связаны с сигнальными путями эстрогена ($p = 0,0039$) и процессами клеточной адгезии ($p = 0,0039$) (Приложение, рис. 3А). В то время как регионы $EP\text{CAM}^+CX\text{CR}4/7^-$ демонстрировали активацию эндцитоза ($p = 0,0359$) и раннюю реакцию на эстроген ($p = 1,435 \times 10^{-7}$) (Приложение, рис. 3Б).

Сравнение $EP\text{CAM}^-$ регионов, основанное на экспрессии генов хемокиновых рецепторов $CX\text{CR}4/7$, выявило значительную активацию ЭМП ($p = 1,6223 \times 10^{-58}$) и путей деградации и абсорбции белка ($p = 5,723 \times 10^{-13}$) в $EP\text{CAM}^+CX\text{CR}4/7^+$ участках (Приложение, рис. 4А). Кроме того, в участках $EP\text{CAM}^+CX\text{CR}4/7^+$ наибольшее количество сверхэкспрессированных генов было связано с ранним ответом на эстроген ($p = 1,442 \times 10^{-13}$) (Приложение, рис. 4Б).

Мы также сравнили транскрипционные профили $EP\text{CAM}^+$ и $EP\text{CAM}^-$ регионов, экспрессирующих $CX\text{CR}4$ и/или $CX\text{CR}7$ (Приложение, табл. 7 и 8). Анализ выявил активацию контрольной точки G2-M в $EP\text{CAM}^+CX\text{CR}4/7^+$ в опухолевых регионах ($p = 1,086 \times 10^{-5}$) (Приложение, рис. 5А). $EP\text{CAM}^+CX\text{CR}4/7^+$ опухолевые регионы характеризовались активацией сигнатуры деградации и абсорбции белков ($p = 4,231 \times 10^{-16}$) и ЭМП ($p = 3,952 \times 10^{-30}$) (Приложение, рис. 5Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты данного исследования позволили выявить выраженную гетерогенность ЦОК у пациентов с РМЖ с различными фенотипическими и транскрипционными

характеристиками, которые коррелируют с клиническими исходами. Объединив данные проточной цитометрии и транскриптомики, мы расширили представление о субпопуляциях ЦОК в зависимости от экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 и их функционального значения.

В литературе относительно мало исследований, посвященных экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 в ЦОК. В частности, в одной из работ была выделена ЦОК из периферической крови с использованием CD45-негативной селекции и последующей ОТ-ПЦР для оценки экспрессии целевых генов [19]. Авторы идентифицировали ЦОК, экспрессирующие эпителиальные маркеры (*KRT19*), а также мезенхимальные маркеры (*TWIST1*, *SNAIL1*, *SLUG* и *ZEB1*), и дополнительно охарактеризовали экспрессию генов различных хемокиновых рецепторов в этих популяциях. Результаты исследования показали, что эпителиальные *KRT19*⁺ ЦОК демонстрируют более высокий уровень экспрессии рецептора CXCR4 и его лиганда SDF-1 по сравнению с мезенхимальными ЦОК. В нашем исследовании анализ методом проточной цитометрии позволил выявить четкую дихотомию в экспрессии CXCR4/7 между различными субпопуляциями эпителиальных ЦОК. В то время как CXCR4/7⁺ ЦОК преобладали среди EpCAM⁺ ЦОК, популяция EpCAM⁻ была обогащена CXCR4/7⁻ клетками. Такая сегрегация позволяет предположить, что эти маркеры определяют отдельные субпопуляции эпителиальных ЦОК с различными биологическими характеристиками.

Важно отметить, что в литературе опухолевые клетки, экспрессирующие CXCR4, часто ассоциируются с опухолевыми стволовыми клетками [20]. Действительно, CXCR4⁺ опухолевые клетки демонстрируют ключевые характеристики стволовых клеток, включая высокую скорость пролиферации, устойчивость к традиционным методам лечения и повышенный метастатический потенциал [21]. В нашем исследовании не выявлена корреляция между признаками стволовости и экспрессией хемокиновых рецепторов CXCR4/7 ни в популяциях EpCAM⁺, ни в EpCAM⁻ ЦОК. Однако выявлены признаки стволовых клеток, характерные для субпопуляций EpCAM⁺ и EpCAM⁻ ЦОК. EpCAM⁺ ЦОК преимущественно характеризовались фенотипом стволовых клеток, определяемым как CD44⁺CD24⁻CD133⁺ALDH⁺, тогда как EpCAM⁻ ЦОК в основном состояли из клеток, не имеющих маркеров стволовости (CD44⁻CD24⁻CD133⁻ALDH⁻). Анализ экспрессии ранних (Snail) и поздних (N-кадгерин и виментин) маркеров ЭМП выявил ассоциацию между экспрессией N-кадгерина и виментина и наличием хемокинового рецептора CXCR4/7 в клетках EpCAM⁻ ЦОК. Фенотип N-кадгерин⁺Snail⁺виментин⁺ преимущественно наблюдался в субпопуляции EpCAM⁻ CXCR4/7⁺ ЦОК. Это согласуется с существующими данными, указывающими на то, что активация сигнальной оси CXCL12/CXCR4 может индуцировать ЭМП в клетках рака молочной железы посредством стимуляции сигнальных путей Wnt/ β -катенин и mTOR [22].

Наши результаты подчеркивают необходимость выхода за рамки обнаружения ЦОК на основе EpCAM. Анализ экспрессии белка CXCR4/7 в ЦОК позволил идентифицировать связь между EpCAM⁻CXCR4/7⁻ и прогрессированием опухоли, что свидетельствует о потенциальной прогностической ценности этой субпопуляции. Хотя клетки, экспрессирующие EpCAM, традиционно считали основным драйвером метастазирования, накапливающиеся данные подчеркивают важность EpCAM⁻ субпопуляции [5]. Потеря экспрессии EpCAM часто связана с ЭМП, при этом гибридный фенотип ЭМП, характеризующийся одновременной экспрессией эпителиальных и мезенхимальных маркеров, считается наиболее агрессивным и метастатическим [23]. В соответствии с этим, EpCAM⁻ CXCR4/7⁻ популяция, выявленная в нашем исследовании, характеризовалась наличием экспрессии маркеров ЭМП N-кадгерин и Snail. Удивительно, но субпопуляция EpCAM⁻ CXCR4/7⁻, а не ожидаемая популяция CXCR4/7⁺, оказалась наиболее прогностически значимой, что указывает на то, что метастатический потенциал может не зависеть от путей распространения, управляемых хемокиновыми рецепторами.

Факт отсутствия прогностической ценности у EpCAM⁻ CXCR4/7⁺ ЦОК (несмотря на статистическую значимость в тестах Манна–Уитни) поднимает важные вопросы. Эти клетки могут находиться в транзитном или спящем состоянии, когда сигнализация CXCR4/7 способствует выживанию в кровотоке, но не напрямую стимулирует опухолевую диссеминацию. Напротив, EpCAM⁻ CXCR4/7⁻ субпопуляция может содержать более агрессивные, ускользающие от иммунного надзора клоны, которые обходят традиционные методы обнаружения, но при этом стимулируют прогрессирование. Уточнение признаков стволовости и ЭМП в выявленной популяции ЦОК показало, что прогрессирование ассоциировано с клетками, характеризующимися стволовостью по экспрессии маркеров CD44/CD24, CD133 и ALDH1A1, а также с фенотипом ЭМП — N-cadherin⁺Snail⁺vimentin⁻. Полученные

результаты согласуются с данными мировой литературы, свидетельствующими о высоком метастатическом потенциале опухолевых клеток с признаками стволовости и ЭМП [24].

Транскриптомный анализ ЦОК выявил разительные различия между субпопуляциями. *EPICAM-CXCR4/7⁺* ЦОК демонстрировали выраженную сверхэкспрессию генов, связанных с ремоделированием внеклеточного матрикса и активацией стромы (*POSTN*, *FN1*, *COL3A1*, *VIM*, *S100A6*, *CD74*), что указывает на роль в формировании преметастатической ниши. Напротив, *EPICAM-CXCR4/7⁻* ЦОК демонстрировали повышенную экспрессию генов *PF4*, *PPBP* и *TUBB1*, связанных с динамикой тромбоцитов и микротрубочек, что потенциально указывает на альтернативные механизмы диссеминации. В частности, у пациентов с прогрессированием опухоли *HBB*, *IGLC2* и *IGHM* были значительно сверхэкспрессированы, что, возможно, отражало иммунный процесс уклонения или клональную селекцию, тогда как *MALAT1* был единственным геном, повышенным у пациентов без прогрессии в периоде наблюдения, что согласуется с его известной ролью в подавлении опухоли. Ген *HBB*, кодирующий бета-глобин (ключевой компонент гемоглобина), играет сложную и контекстно-зависимую роль в развитии РМЖ. Хотя экспрессия *HBB* традиционно ассоциируется с эритроцитами, он также был обнаружен в клетках РМЖ, где его функция, по-видимому, двойственна. В некоторых исследованиях сообщается, что повышенная экспрессия *HBB* коррелирует с повышенной агрессивностью опухоли, повышенным метастатическим потенциалом и неблагоприятным прогнозом для пациента [25]. Другие исследования, напротив, позволяют предположить, что *HBB* может оказывать опухолесупрессивное действие при определенных типах рака [26]. Два других идентифицированных дифференциально экспрессируемых гена связаны с синтезом иммуноглобулинов. Ген *IGLC2* кодирует константную область легкой цепи иммуноглобулина λ , которая участвует в связывании антигена. На сегодняшний день единственное доступное исследование, связывающее экспрессию *IGLC2* с РМЖ, указывает на его роль как предиктора благоприятного клинического исхода при подтипе трижды негативного РМЖ [27]. Напротив, в настоящее время нет данных относительно ассоциации экспрессии *IGHM*, который кодирует константную область тяжелой цепи иммуноглобулина M, с ростом или прогрессированием опухоли. В группе пациентов без признаков прогрессирования была обнаружена сверхэкспрессия только гена *MALAT1*. *MALAT1* представляет собой длинную некодирующую РНК, ассоциированную с метастазами при аденокарциноме легких. Ее функция связана с регуляцией подвижности клеток и инвазивного потенциала [28]. Сообщалось также о том, что *MALAT1* подавляет метастазирование РМЖ [29]. В частности, исследование показало, что *MALAT1* может связываться с прометастатическим фактором транскрипции TEAD, инактивируя его и тем самым ингибируя миграцию и инвазию опухолевых клеток. Кроме того, авторы наблюдали, что экспрессия *MALAT1* часто снижается при более агрессивных и метастатических формах РМЖ, что подтверждает его роль как супрессора метастазирования.

Пространственная транскриптомика первичных опухолей молочной железы дополнительно подтвердила эти результаты, показав, что регионы *EPICAM-CXCR4/7⁺* были обогащены генами, связанными с внеклеточным

матриксом (*COL1A1*, *COL3A1*, *FN1*, *POSTN*, *SPARC*, *BGN*), что указывает на фиброзное, иммуномодулированное микроокружение. Напротив, регионы *EPCAM-CXCR4/7*-сверхэкспрессировали широкий спектр генов, среди которых *STC2*, *TFF3*, *NPNT* и *CD24* были наиболее функционально значимыми, по нашему мнению, что указывает на особенности, связанные с агрессивным фенотипом. Несмотря на противоречивую связь с прогнозом, по последним данным, *STC2*, секретлируемый ауто- или паракринно, функционирует как лиганд, способствуя выживанию клеток путем смягчения окислительного стресса [30]. Экспрессия фактора TGF β 3 (*TFF3*) в опухолевой ткани считается прогностическим индикатором покоящегося ER⁺ рака молочной железы, при этом TFF3 функционирует как эпигенетически регулируемый драйвер поведения, связанного с покоем [31]. Эксперимент продемонстрировал, что подавление NPNT снижает адгезию раковых клеток к остеобластам, что подтверждает его роль в метастазировании в кости при РМЖ [32]. Несколько генов в регионах *EPCAM-CXCR4/7* (*CDH1*, *CRABP2*, *THSD4*, *SERPINA1*, *SERPINA3*, *HSPB1*, *KRT8*, *CD9*, *NUPR1*, *AZGP1*) связаны с подавлением миграции и инвазии. Однако, существование механизмов интравазации, не требующих инвазии, и вышеизложенные данные могут указывать на функциональный метастатический фенотип, характерный для этой популяции. Вероятно, этот фенотип способен противостоять воздействию агрессивной среды, оставаясь в состоянии покоя и адаптируясь в преметастатической нише.

Эти результаты ставят под сомнение общепринятые представления о биологии ЦОК, поскольку субпопуляция ErCAM⁻ оказалась ключевым предиктором прогрессирования. Примечательно, что ErCAM⁻CXCR4/7⁺ ЦОК демонстрируют способность к ремоделированию внеклеточного матрикса, тогда как ErCAM⁻CXCR4/7⁻ субпопуляция может содержать более агрессивные клоны. Необходимы дальнейшие функциональные исследования для выяснения механистической роли этих субпопуляций ЦОК в метастазировании и резистентности к терапии.

Несмотря на значимые результаты, данное исследование имеет ряд существенных ограничений. Основной целью была характеристика ЦОК на основе экспрессии хемокиновых рецепторов CXCR4 и CXCR7 и их роли в рецептор-опосредованных путях распространения. Однако проспективный дизайн исследования ограничил набор пациентов с прогрессией, в результате чего было выявлено только три случая прогрессирования заболевания. Хотя небольшой размер выборки не позволяет сделать окончательные выводы, полученные результаты служат ценной основой для будущих исследований, направленных на выявление патогенетически значимых субпопуляций ЦОК. В частности, наш повторный анализ транскриптомных данных отдельных клеток подтвердил функциональные профили ЦОК, связанные с прогрессированием. Дополнительное подтверждение

этому дают данные пространственной транскриптомики, которые выявили гетерогенность, связанную с CXCR4/7, в первичной опухоли, что согласуется с нашими результатами, полученными на материале ЦОК, и подчеркивает их биологическую значимость. Важно подчеркнуть, что данное наблюдательное исследование выявляет ассоциации между фенотипами ЦОК и клиническими исходами, однако требуют механистической валидации *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, пространственная транскриптомика, хотя и информативна в отношении микроокружения опухоли, имеет ограниченное разрешение (~55 мкм), что может привести к усреднению сигнала по разным типам клеток. Эти ограничения не умаляют значимости полученных результатов, а, напротив, подчеркивают необходимость дальнейших исследований с более крупными когортами, с использованием анализа отдельных клеток и функциональных экспериментов для подтверждения выявленных закономерностей. Полученные данные создают прочную основу для расширенных исследований роли ЦОК, экспрессирующих CXCR4/7, в прогрессировании РМЖ.

Выводы

Принимая во внимание ограничения данного исследования, в частности, небольшой размер выборки пациентов с прогрессированием заболевания в период наблюдения, можно сделать несколько выводов. Прогрессирование опухоли, характеризующееся диссеминацией опухолевых клеток в отдаленные органы, может быть напрямую не связано с наличием рецепторов CXCR4 и CXCR7 в ЦОК. В то же время популяция ErCAM⁻ ЦОК, по-видимому, имеет патогенетическое значение для прогрессирования опухоли. Количество ErCAM⁻ ЦОК, независимо от экспрессии CXCR4 и CXCR7, было выше у пациентов с прогрессированием в период наблюдения. Этот факт подчеркивает необходимость смещения фокуса исследований ЦОК с ErCAM⁺, которые на протяжении более двух десятилетий демонстрировали ограниченную прогностическую ценность при раннем РМЖ, на ErCAM⁻ субпопуляцию. Транскриптомный анализ *EPCAM-CXCR4/7*-ЦОК выявил различные профили экспрессии генов; однако их точная роль в прогрессировании РМЖ остается недостаточно изученной. Учитывая как количественные, так и качественные изменения в этих клетках, вполне вероятно, что пациенты с неблагоприятным прогнозом характеризуются не только повышенным количеством *EPCAM-CXCR4/7*-ЦОК, но и изменениями их функциональных свойств.

Доступность данных

Наборы данных, проанализированные в данном исследовании, доступны в базе данных Gene Expression Omnibus (GEO) под номером доступа GSE242311 и в BioProject под номером доступа PRJNA776403.

Литература

1. Thomas-Bonafos T, Pierga JY, Bidard FC, Cabel L, Kiavue N, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: clinical validity and utility. *NPJ Breast Cancer*. 2024; 10: 103.
2. Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, Chen Y, Zhou J, Ji F, Wang L, et al. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res*. 2022; 10: 58.
3. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells*. 2020; 9: 1836.
4. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B,

- Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 920–28.
5. Ye F, Zhong X, Qiu Y, Yang L, Wei B, Zhang Z, Bu H. The presence of EpCAM/CD49f⁺ cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome. *J Breast Cancer.* 2015; 18: 242–8.
 6. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. Cell. 2016; 166: 21–45.
 7. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med.* 2019; 216: 1016–26.
 8. Rueda A, Serna N, Mangues R, Vázquez E, Villaverde A. Targeting the chemokine receptor CXCR4 for cancer therapies. *Biomark Res.* 2025; 13: 68.
 9. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014; 124: 31–82.
 10. Boldajipour B, Mahabaleswar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell.* 2008; 132: 463–73.
 11. Yang Y, Li J, Lei W. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. *Int J Biol Sci.* 2023; 19: 3341–59.
 12. Wu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 4953–64.
 13. Pospelova RA. Leukocyte concentration in clinical practice: diagnostic value. M.: Meditsina, 1973.
 14. Menyailo M, Zainullina V, Khozyainova A, Tashireva L, Zolotareva S, Gerashchenko T, et al. Heterogeneity of Circulating Epithelial Cells in Breast Cancer at Single-Cell Resolution: Identifying Tumor and Hybrid Cells. *Adv Biol (Weinh).* 2023; 7: e2200206.
 15. Satija Lab. Seurat: Tools for Single Cell Genomics. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/satijalab/seurat>.
 16. McGinnis CS. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/chris-mcginnis-ucsf/DoubletFinder>.
 17. Tashireva L, Grigoryeva E, Alifanov V, et al. Spatial Heterogeneity of Integrins and Their Ligands in Primary Breast Tumors. *Discov Med.* 2023; 35: 910–20.
 18. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 2019; 20: 296.
 19. Mego M, Cholujova D, Minarik G, Sedlackova T, Gronesova P, Karaba M, et al. CXCR4-SDF-1 interaction potentially mediates trafficking of circulating tumor cells in primary breast cancer. *BMC Cancer.* 2016; 16: 127T.
 20. Shi Q, Yang W, Ouyang Y, Zhou S, Xu L, Liu J, et al. CXCR4 promotes tumor stemness maintenance and CDK4/6 inhibitors resistance in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2025; 27: 15.
 21. Nengroo MA, Maheshwari S, Singh A, Verma A, Arya RK, Chaturvedi P, et al. CXCR4 intracellular protein promotes drug resistance and tumorigenic potential by inversely regulating the expression of Death Receptor 5. *Cell Death Dis.* 2021; 12: 464.
 22. Garg P, Jallepalli VR, Verma S. Unravelling the CXCL12/CXCR4 Axis in breast cancer: Insights into metastasis, microenvironment interactions, and therapeutic opportunities. *Hum Gene.* 2024; 40: 201272.
 23. Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018; 1870: 151–7.
 24. Fabregat I, Malfettone A, Soukupova J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J Clin Med.* 2016; 5: 37.
 25. Ponzetti M, Capulli M, Angelucci A, Delle Monache S, Sica AR, Festuccia C, et al. Non-conventional role of haemoglobin beta in breast malignancy. *Br J Cancer.* 2017; 117: 994–1006.
 26. Zhang X, Yang H, Zhang L, Li Y, Ma H. A Pan-Cancer Analysis of the Hemoglobin Subunit Beta (HBB) in Human Tumors. *Front Genet.* 2022; 13: 880647.
 27. Chang YT, Tsai WC, Lin WZ, Chen YS, Hou MF, Wu YC, et al. A Novel IGLC2 Gene Linked With Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 2022; 11: 759952.
 28. Tsyganov MM, Ibragimova MK. MALAT1 Long Non-coding RNA and Its Role in Breast Carcinogenesis. *Acta Naturae.* 2023; 15: 32–41.
 29. Kim J, Piao HL, Kim BJ, Yao F, Han Z, Wang Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet.* 2018; 50: 1705–15.
 30. Qie S, Xiong H, Liu Y, et al. Stanniocalcin 2 governs cancer cell adaptation to nutrient insufficiency through alleviation of oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2024; 15: 567. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06961-7>.
 31. Chen S, Zhang X, Basappa B, et al. TFF3 facilitates dormancy of anti-estrogen treated ER+ mammary carcinoma. *Commun Med.* 2025; 5: 45. <https://doi.org/10.1038/s43856-024-00710-9>.
 32. Wang D, Zhao C, Gao L, Wang Y, Gao X, Tang L, et al. NPNT promotes early-stage bone metastases in breast cancer by regulation of the osteogenic niche. *J Bone Oncol.* 2018; 13: 91–96. DOI: 10.1016/j.jbo.2018.09.006.

References

1. Thomas-Bonafos T, Pierga JY, Bidard FC, Cabel L, Kiavue N, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: clinical validity and utility. *NPJ Breast Cancer.* 2024; 10: 103.
2. Ju S, Chen C, Zhang J, Xu L, Zhang X, Li Z, Chen Y, Zhou J, Ji F, Wang L, et al. Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomark Res.* 2022; 10: 58.
3. Eslami-S Z, Cortés-Hernández LE, Alix-Panabières C. Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells.* 2020; 9: 1836.
4. Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: A validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 920–28.
5. Ye F, Zhong X, Qiu Y, Yang L, Wei B, Zhang Z, Bu H. The presence of EpCAM/CD49f⁺ cells in breast cancer is associated with a poor clinical outcome. *J Breast Cancer.* 2015; 18: 242–8.
6. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. *Cell.* 2016; 166: 21–45.
7. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med.* 2019; 216: 1016–26.
8. Rueda A, Serna N, Mangues R, Vázquez E, Villaverde A. Targeting the chemokine receptor CXCR4 for cancer therapies. *Biomark Res.* 2025; 13: 68.
9. Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014; 124: 31–82.
10. Boldajipour B, Mahabaleswar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell.* 2008; 132: 463–73.
11. Yang Y, Li J, Lei W. CXCL12-CXCR4/CXCR7 Axis in Cancer: from Mechanisms to Clinical Applications. *Int J Biol Sci.* 2023; 19: 3341–59.
12. Wu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 4953–64.
13. Pospelova RA. Leukocyte concentration in clinical practice: diagnostic value. M.: Meditsina, 1973.
14. Menyailo M, Zainullina V, Khozyainova A, Tashireva L, Zolotareva S, Gerashchenko T, et al. Heterogeneity of Circulating Epithelial Cells in Breast Cancer at Single-Cell Resolution: Identifying Tumor and Hybrid Cells. *Adv Biol (Weinh).* 2023; 7: e2200206.
15. Satija Lab. Seurat: Tools for Single Cell Genomics. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/satijalab/seurat>.
16. McGinnis CS. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data. GitHub. 2023. Available from: <https://github.com/chris-mcginnis-ucsf/DoubletFinder>.
17. Tashireva L, Grigoryeva E, Alifanov V, et al. Spatial Heterogeneity of Integrins and Their Ligands in Primary Breast Tumors. *Discov Med.* 2023; 35: 910–20.

18. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 2019; 20: 296.
19. Mego M, Cholujoval D, Minarik G, Sedlackova T, Gronosova P, Karaba M, et al. CXCR4-SDF-1 interaction potentially mediates trafficking of circulating tumor cells in primary breast cancer. *BMC Cancer.* 2016; 16: 127T.
20. Shi Q, Yang W, Ouyang Y, Zhou S, Xu L, Liu J, et al. CXCR4 promotes tumor stemness maintenance and CDK4/6 inhibitors resistance in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2025; 27: 15.
21. Nengroo MA, Maheshwari S, Singh A, Verma A, Arya RK, Chaturvedi P, et al. CXCR4 intracellular protein promotes drug resistance and tumorigenic potential by inversely regulating the expression of Death Receptor 5. *Cell Death Dis.* 2021; 12: 464.
22. Garg P, Jallepalli VR, Verma S. Unravelling the CXCL12/CXCR4 Axis in breast cancer: Insights into metastasis, microenvironment interactions, and therapeutic opportunities. *Hum Gene.* 2024; 40: 201272.
23. Jolly MK, Mani SA, Levine H. Hybrid epithelial/mesenchymal phenotype(s): The 'fittest' for metastasis? *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2018; 1870: 151–7.
24. Fabregat I, Malfettone A, Soukupova J. New Insights into the Crossroads between EMT and Stemness in the Context of Cancer. *J Clin Med.* 2016; 5: 37.
25. Ponzetti M, Capulli M, Angelucci A, Delle Monache S, Sica AR, Festuccia C, et al. Non-conventional role of haemoglobin beta in breast malignancy. *Br J Cancer.* 2017; 117: 994–1006.
26. Zhang X, Yang H, Zhang L, Li Y, Ma H. A Pan-Cancer Analysis of the Hemoglobin Subunit Beta (HBB) in Human Tumors. *Front Genet.* 2022; 13: 880647.
27. Chang YT, Tsai WC, Lin WZ, Chen YS, Hou MF, Wu YC, et al. A Novel IGLC2 Gene Linked With Prognosis of Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol.* 2022; 11: 759952.
28. Tsyganov MM, Ibragimova MK. MALAT1 Long Non-coding RNA and Its Role in Breast Carcinogenesis. *Acta Naturae.* 2023; 15: 32–41.
29. Kim J, Piao HL, Kim BJ, Yao F, Han Z, Wang Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet.* 2018; 50: 1705–15.
30. Qie S, Xiong H, Liu Y, et al. Stanniocalcin 2 governs cancer cell adaptation to nutrient insufficiency through alleviation of oxidative stress. *Cell Death Dis.* 2024; 15: 567. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06961-7>.
31. Chen S, Zhang X, Basappa B, et al. TFF3 facilitates dormancy of anti-estrogen treated ER+ mammary carcinoma. *Commun Med.* 2025; 5: 45. <https://doi.org/10.1038/s43856-024-00710-9>.
32. Wang D, Zhao C, Gao L, Wang Y, Gao X, Tang L, et al. NPNT promotes early-stage bone metastases in breast cancer by regulation of the osteogenic niche. *J Bone Oncol.* 2018; 13: 91–96. DOI: 10.1016/j.jbo.2018.09.006.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОРТРЕТЫ ВОЛГО-ОКСКОГО РЕГИОНА В КОНТЕКСТЕ ГЕНОФОНДА ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ (Y-SNP ПОЛИМОРФИЗМ)

Г. Ю. Пономарев¹✉, А. Г. Шлыков¹, И. О. Горин¹, М. М. Воронина¹, А. Ю. Потанина¹, В. А. Петров¹, С. М. Кошель², Д. С. Адамов¹, Е. В. Балановская¹

¹ Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

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

Актуальную проблему роли славянской экспансии в формировании генофондов народонаселения Европы активно анализируют с применением разных методов изучения древних и современных популяций. Но ее решение затрудняет отсутствие сводных данных о гаплогруппах Y-хромосомы в славяно-, финно- и тюркоязычных популяциях европейской части России. Цель работы — рассмотреть генетические портреты популяций Мордовии и русских Рязанской области в сравнении с окружающими популяциями коренного народонаселения Центральной России. Y-генофонд Волго-Окского региона (10 популяций, $n = 1136$ индивидов) изучен в широком контексте собственных данных о генофондах европейской части России (по единой панели 35 Y-гаплогрупп, 80 популяций, $n = 9712$). Анализ проведен методами многомерного шкалирования (MDS) и компьютерной картографии (GeneGeo). Созданная серия 35 карт Y-генофонда Центральной России и карт генетических расстояний от народов Волго-Окского региона детально описывает геногеографический ландшафт региона. Показано, что все изученные русские популяции входят в единый «славянский» кластер, включающий также представителей западных славян. К русским популяциям Центральной России наиболее генетически близким оказался кластер популяций Волго-Уральского региона, включающий три финноязычные популяции Мордовии (эрзя, мокша, шокша) и семь тюркоязычных популяций чувашей и мишарей. Выдвинута гипотеза, что этот массив популяций восходит к генофонду древнего автохтонного финноязычного населения Волго-Окского региона.

Ключевые слова: генофонд, геногеография, Y-хромосома, гаплогруппы, славянская экспансия, Центральная Россия, Волго-Окский регион

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 25-28-01594.

Благодарности: авторы благодарны всем участникам экспедиционного обследования, предоставившим свои биологические образцы для исследования, администрации и сотрудникам Министерства здравоохранения Рязанской области и Республики Мордовия за организационную поддержку и содействие в проведении экспедиций, а также Биобанку Северной Евразии за предоставление коллекций ДНК.

Вклад авторов: Г. Ю. Пономарев — генотипирование и анализ Y-SNP маркеров, дизайн исследования; А. Г. Шлыков — организатор экспедиционного обследования генофонда Рязанской области и Мордовии; Г. Ю. Пономарев, М. М. Воронина, В. А. Петров — участники экспедиций, анализ анкетных данных; Д. С. Адамов, А. Ю. Потанина, И. О. Горин — статистический анализ; С. М. Кошель — картографический анализ; Д. С. Адамов, Е. В. Балановская — дизайн исследования и подготовка рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медико-генетического научного центра имени Н. П. Бочкова (протокол № 1 от 29 июня 2020 г.). Данные получены при добровольном письменном информированном согласии участников обследования и деперсонифицированы.

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

Статья получена: 16.10.2025 **Статья принята к печати:** 22.11.2025 **Опубликована онлайн:** 01.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.062

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/>).

GENETIC PORTRAITS OF VOLGA–OKA REGION IN THE CONTEXT OF THE CENTRAL RUSSIA'S GENE POOL (Y-SNP POLYMORPHISM)

Ponomarev GYu¹✉, Shlykov AG¹, Gorin IO¹, Voronina MM¹, Potanina AYU¹, Petrov VA¹, Koshel SM², Adamov DS¹, Balanovska EV¹

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

An urgent problem of the role of Slavic expansion in shaping gene pools of the population of Europe is being analyzed actively using various methods to study ancient and current populations. However, it is difficult to solve due to the lack of consolidated data on the Y-haplogroups in Slavic-, Finnish-, and Turkic-speaking populations of European Russia. The study aimed to look into genetic portraits of Mordovian populations and Russians of the Ryazan Region relative to the surrounding populations of indigenous peoples of Central Russia. For the first time the Y-gene pool of the Volga–Oka region (10 populations, $n = 1136$ individuals) was assessed in a broad context of our own data on the gene pools of European Russia (based on a single panel of 35 Y-haplogroups, 80 populations, $n = 9712$). The analysis was performed by multidimensional scaling (MDS) and computed cartography (GeneGeo). The produced series of 35 maps of the Y-gene pool of Central Russia and maps of genetic distances from peoples of the Volga–Oka region describe the gene-geographic landscape of the region in detail. It has been shown that all the assessed Russian populations belong to the common “Slavic” cluster that also includes representatives of Western Slavs. The cluster of populations of the Ural–Volga region including three Finnish-speaking populations of Mordovia (Erzya, Moksha, Shoksha) and 7 Turkic-speaking populations of the Chuvash and Mishar turned out to be the most genetically close to the Russian populations of Central Russia. It has been hypothesized that this group of populations can be traced back to the gene pool of the ancient indigenous Finnish-speaking population of the Volga–Oka region.

Keywords: gene pool, gene geography, Y-chromosome, haplogroups, Slavic expansion, Central Russia, Volga–Oka region

Funding: the study was supported by the RSF grant No. 25-28-01594.

Acknowledgements: the authors would like to thank all participants of the expedition survey, who provided their biological samples for the study, to Administration and employees of the Ministry of Healthcare of the Ryazan Region and Republic of Mordovia for institutional support and assistance in conducting expeditions, as well as to Biobank of North Eurasia for access to DNA collections.

Author contribution: Ponomarev GYu — genotyping and Y-SNP marker analysis, study design; Shlykov AG — manager of the expedition survey of the gene pool of the Ryazan Region and Mordovia; Ponomarev GYu, Voronina MM, Petrov VA — expedition members, questionnaire survey data analysis; Adamov DS, Potanina AYU, Gorin IO — statistical analysis; Koshel SM — cartographic analysis; Adamov DS, Balanovska EV — study design and manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol No. 1 dated 29 June 2020). The data were acquired after obtaining the written informed consent from the assessed individuals and anonymised.

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

Received: 16.10.2025 **Accepted:** 22.11.2025 **Published online:** 01.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.062

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/>).

За последнее десятилетие изучение вопроса о происхождении современных славяноязычных народов поднялось на новый уровень благодаря исследованиям современной и древней ДНК. Генетические данные об аутосомной ДНК, Y-хромосоме, митохондриальной ДНК дают возможность увидеть разные аспекты взаимодействия дославянских и славянских популяций во время мощной экспансии славянских племен по обширным территориям Европы в период VI–XII вв. Одним из основных вопросов этого взаимодействия является соотношение между двумя процессами: сменой популяции (полная замена генофонда автохтонного населения пришлыми племенами славян) и ассимиляцией дославянского населения («славянизацией» — взаимопроникновением генофондов славянского и дославянского населения с принятием культуры славян). Накопленные к настоящему времени исторические, археологические, лингвистические и генетические данные не позволяют дать однозначный ответ на этот вопрос.

Синтез данных по аутосомному геному, Y-хромосоме и мтДНК современного славянского населения показал, что большая часть балто-славянской генетической изменчивости в основном связана с ассимиляцией дославянских генофондов, которые были разными у западных, восточных и южных славян [1].

В 2025 г. опубликованы две значительные работы, авторы которых взаимодействие дославянского населения и славянских племен анализировали по различным системам генетических данных современных популяций и древней ДНК. Были исследованы аутосомные геномы древних образцов ($n = 555$) из погребений восточной Германии, северо-западных Балкан, Польши (и северо-запада Украины), датированных периодом до (с VI–VII вв.) и после славянской экспансии [2]. Кроме этих трех основных территориальных кластеров приведены данные и по Волго-Окскому региону. Для расчета степени замещения коренного населения были использованы образцы из самых ранних славянских ингумаций, пришедших на смену обряда кремации (Грубешовский повет, Польша, 600–900 гг.). ДНК этих образцов была использована в расчете предковых компонент (qpAdm) в качестве эталона. Результаты расчетов привели авторов к выводу о доминировании процесса интенсивного замещения населения на территории славянской экспансии: славяне заместили $82 \pm 1\%$ местного генофонда на северо-западных Балканах, $83 \pm 6\%$ в восточной Германии, $93 \pm 3\%$ в Польше и северо-западной Украине. Намного меньшие показатели в Волго-Окском регионе: $65 \pm 4\%$ автохтонного населения замещены прибывшими славянскими мигрантами [2].

Вторая работа была выполнена нашим коллективом по данным об Y-хромосоме и ограничивалась северо-восточной периферией славянской экспансии — Волго-Окским регионом [3]. В современных Y-генофондах населения Волго-Окского междуречья ($n = 935$) доминирует гаплогруппа R1a: 56% у русских Рязанской области и 44% в коренном населении Мордовии. Поэтому основное внимание авторов было уделено комплексному анализу углубленных данных по Y-SNP и Y-STR полиморфизмам гаплогрупп R1a-CTS1211 и R1a-Z92, совместно с пятью древними образцами VI–XII вв. Расчет возраста ближайшего общего предка (TMRCA) двумя независимыми методами выявил 10 информативных кластеров на филогенетических сетях 37-маркерных Y-STR гаплотипов с возрастом 1600–2900 лет, т. е. до начала славянской экспансии. Около половины русских Рязанской области, носителей исследованных ветвей R1a, могут быть

потомками по мужской линии дославянского населения региона, предположительно древних автохтонных финноязычных племен. В отличие от итогов предыдущей работы [2], мы пришли к выводу о том, что русское население Волго-Окского междуречья сформировалось в значительной степени путем культурной ассимиляции, а не путем полного замещения славянами дославянского населения. Этот важный вывод поддерживается и более ранними работами нашего коллектива по Y-хромосоме [1, 4–9] и аутосомному генофонду [1, 10].

Выводы о замещении около 65% генофонда дославянского населения Волго-Окского региона [2] основаны на данных о древней ДНК Суздальского ополья ($n = 31$), полученных другим коллективом, который, фиксируя изменения генофонда при распространении славян, более осторожен в выводах о масштабах замещения [11]. Эти авторы указывают, что средневековое Суздальское княжество населяли разнообразные этносы, сформировавшие в итоге смешанное, но полностью русскоязычное население, которое населяет этот регион сегодня.

Очевидно, что требуются дальнейшие исследования, чтобы прояснить столь важный вопрос: каково соотношение процесса интенсивного замещения автохтонного населения славянами с процессом взаимопроникновения их генофондов. Ответ на него затрудняет отсутствие сводных данных о гаплогруппах Y-хромосомы в различных славяно-, финно- и тюркоязычных популяциях европейской части России. Такая брешь в наших знаниях препятствует дальнейшему решению проблемы о характере взаимодействия славянского и дославянского населения на территории России. Цель данной работы — провести сравнительный анализ основных гаплогрупп Y-хромосомы современного населения Волго-Окского региона в контексте генофонда центральной европейской части России, который поможет восполнить этот пробел.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные о современном коренном населении Волго-Окского региона были собраны в ходе экспедиционных обследований 2005–2023 гг. (суммарно $n = 1136$): в Рязанской области ($n = 497$; Кадомский, Касимовский, Михайловский, Сапожковский, Сараевский, Спасский, Шиловский районы) и в Республике Мордовия ($n = 639$; Ардатовский, Инсарский, Ичалковский, Краснослободский, Лукьяновский, Рузаевский, Теньгушевский, Торбеевский, Чамзинский районы). Критерии включения в выборку: образцы только от неродственных мужчин, чья этническая принадлежность подтверждена на глубину трех поколений.

Выделение ДНК проводили методом очистки нуклеиновых кислот на магнитных частицах на станции QIAasympphony (Qiagen; Германия). Генотипирование Y-SNP маркеров выполнено методом TaqMan Open Array на амплификаторе QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific; США) с использованием кастомных пластин.

Данные о генофонде 80 популяций коренного населения Центральной России ($n = 9712$), предоставленные Биобанком Северной Евразии [12], изучали по единой панели 35 гаплогрупп: C-M217, D-M174, E-M96, G1-M285, G2-P15, G-M201(xM285,P15), H-M69, I-M170(xM253,M223,P37), I-M223, I-M253, I-P37, J1-M267, J2-M172, L-M20, N2-P43, N3a1-B211, N3a2-M2118, N3a3-CTS10760, N3a4-Z1936, N3a5a-F4205, N-M231(xP43,M178), O-M175, Q-M242, R1a-M198(xM458,CTS1211,Z92,Z93), R1a-CTS1211, R1a-M458,

Таблица. Частоты гаплогрупп Y-хромосомы (в %) в коренном населении Рязанской области и Мордовии

Популяции	Сводные данные по популяциям			Популяции русских 7 районов Рязанской области				Популяции Мордовии		
	Волго-Окский регион	Русские Рязанской области	Мордовия	Кадомский	Касимовский	Шиловский	Суммарно четыре других района	Эрзя	Мокша	Шокша*
Количество образцов	1136	497	639	79	110	91	217	322	252	65
R1a (всего)	50,7	57,3	45,5	58,2	63,6	58,2	53,5	55,3	33,3	44,6
R1a-CTS1211	31,9	28,4	34,6	20,3	44,5	35,2	20,4	41,6	24,2	40,0
R1a-Z92	9,8	17,3	3,9	17,7	6,4	13,2	24,5	4,0	4,4	1,5
R1a-PF6202 (eq.M458)	4,0	7,2	1,4	5,1	9,1	8,8	6,5	2,5	0,4	–
R1a-Z93	2,9	1,9	3,8	3,8	1,8	–	2,0	6,5	1,2	–
R1a-M198*	2,1	2,5	1,8	11,3	1,8	1,0	0,1	0,7	3,1	3,1
N3 (всего)	14,1	11,3	16,3	11,4	16,4	5,5	11,1	13,0	13,5	43,1
N3a1-B211	5,7	0,2	10,0	–	–	1,1	–	8,7	8,3	23,1
N3a3-CTS10760 (eq.VL29)	4,7	6,6	3,1	6,3	8,2	4,4	6,9	0,6	4,8	9,2
N3a4-Z1936	3,7	4,4	3,1	5,1	8,2	–	4,1	3,7	0,4	10,8
Гаплогруппы (xR1a, N3)	35,2	31,4	38,2	30,4	20,0	36,3	35,5	31,7	53,2	12,3
E-M78	6,7	4,6	8,3	1,3	0,9	5,5	7,4	2,8	16,7	3,1
J2-M172	6,1	2,0	9,2	–	2,7	1,1	2,8	5,6	15,9	1,5
I1-M253	4,4	4,0	4,7	7,6	0,9	3,3	4,6	8,7	0,8	–
I2-P37.2	4,0	8,5	0,6	8,9	8,2	11,0	7,4	0,9	0,4	–
G2-P15	3,8	1,4	5,6	–	0,9	4,4	0,9	4,0	9,1	–
R1b-L51	3,7	1,8	5,2	2,5	2,7	1,1	1,4	3,4	7,1	6,2
R1b-Z2105	2,2	1,6	2,7	5,1	1,8	2,2	–	5,0	0,4	–
Другие	4,3	7,4	1,9	5,1	1,8	7,7	11,1	1,2	2,8	1,5

Примечание: красным фоном выделены значения, соответствующие 5% критерию полиморфизма. Гаплогруппы указаны в порядке убывания их частоты в генофонде Волго-Окского региона. * Шокша — не общепринятое название популяции эрзян Теньгушевского района на северо-западе Мордовии.

R1a-Z92, R1a-Z93, R1b-M343(xM269,M73), R1b-M269 (xL51,Z2105), R1b-L51, R1b-M73, R1b-Z2105, R2-M124, T-M70. Они дополнены данными о 10 популяциях Латвии, Литвы, Польши, Финляндии, Швеции и Эстонии из публикаций [13–15]. По частотам 35 Y-гаплогрупп была рассчитана матрица попарных генетических расстояний Нея между 90 популяциями (DJgenetics [4]) и созданы графики многомерного шкалирования (MDS) в программе Statistica version 7.1 (TIBCO Software, США).

Карты распространения гаплогрупп Y-хромосомы и карты генетических расстояний созданы в пакете GeneGeo 2.8 [16] методом средневзвешенной интерполяции с радиусом влияния 500 км и степенью убывания весовой функции 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разнообразие Y-генофонда Волго-Окского региона

Среди 28 Y-гаплогрупп, обнаруженных в генофонде изученных популяций Волго-Окского региона, доминирует макрогаплогруппа R1a, составляя в среднем 51% (таблица). Но популяции региона значительно различаются по ее частоте: минимум 33% у мокши, максимум 64% у русских Касимовского района Рязанской области. Большинство остальных гаплогрупп варьируют еще значительно (рис. 1). Так, частота гаплогруппы N3 колеблется от 5,5% у русских Шиловского района до 43% у шокши. В категорию «другие» (таблица) отнесены гаплогруппы с частотами 5% у всех исследованных популяций (C-M217, G1-M285,

I2-M223, J1-M267, L-M20, N2-P43, N-M231*, Q-M242, R1a-M198*, R1b-M269*, R1b-M73, R2a-M124, T1a-M70).

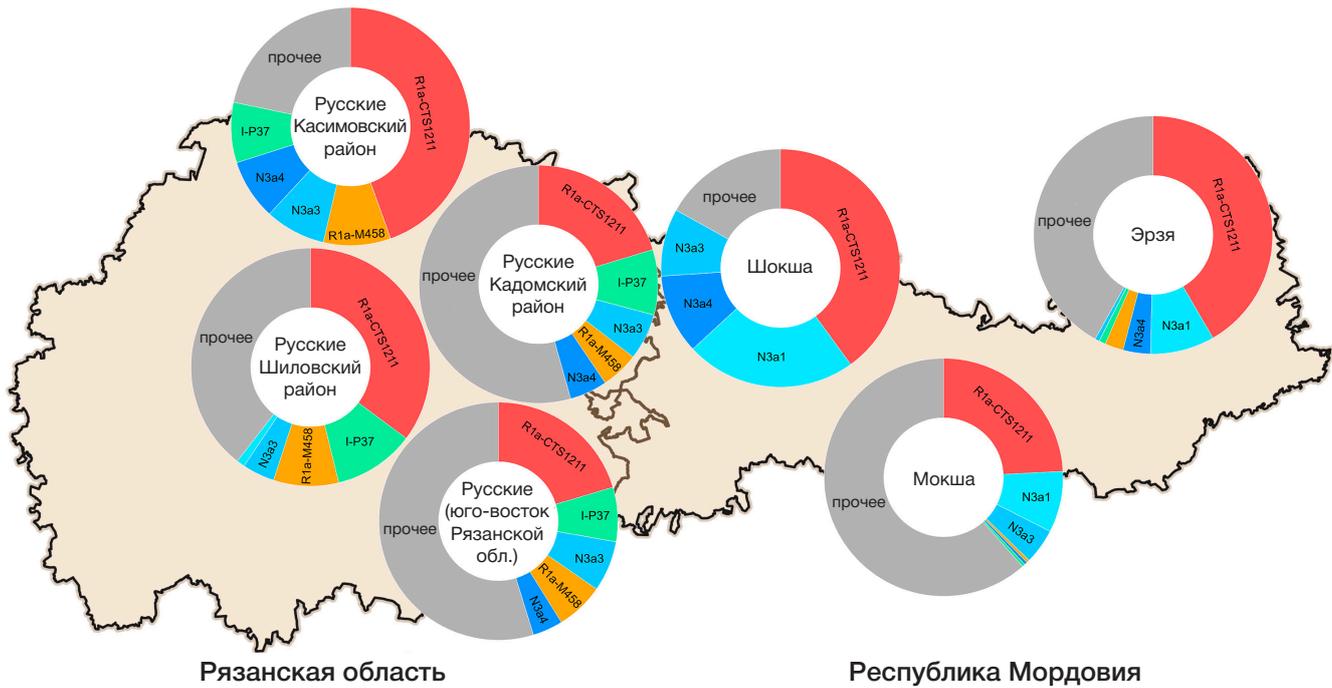
В генофонде русских Рязанской области гаплогруппы распределились по убыванию частоты следующим образом: R1a-CTS1211 (28%), R1a-Z92 (17%), I2a-P37.2 (9%), R1a-M458 (7%). Эта совокупность условно «славянских» гаплогрупп характерна для русских популяций центральной и южной России в целом [4]. Из условно «уральских» гаплогрупп наиболее часты N3a3 (7%) и N3a4 (4%).

Генофонд эрзян близок к русским популяциям Рязанской области: высока частота R1a (55%), причем ветвь R1a-CTS1211 (44%) у эрзян встречается гораздо чаще, чем R1a-Z92 (4%). В генофонде эрзян гаплогруппы R1a-Z93 (6,5%), N3a1 (9%) и I1-M253 (9%) распространены с более высокими частотами, чем в русских популяциях.

У шокши (теньгушевские эрзяне) доминирует макрогаплогруппа N3 (43%), что резко отличает их от эрзян (13%). Все три ветви N3 в генофонде шокши достигают максимальных значений в Волго-Окском регионе: N3a1 (23%), N3a4 (11%), N3a3 (9%). По частоте R1a-CTS1211 (40%) шокша близка к эрзянам (44%).

Своеобразие генофонда мокши заключается не только в снижении частоты R1a (33%), но и в повышении частот гаплогрупп E-M78 (17%), J2-M172 (16%), G2-P15 (9%), R1b-L51 (7%).

Частоты Y-хромосомных гаплогрупп выявили достоверные генетические различия между популяциями Мордовии, что указывает на необходимость рассмотрения их как отдельных популяций, не позволяя объединять в единую группу «мордва».



Рязанская область Республика Мордовия

Рис. 1. Генетические портреты популяций Волго-Окского региона (в рамках границ Рязанской области и Мордовии). Для всех популяций приведены данные по условно «славянским» гаплогруппам R1a-CTS1211, R1a-M458, I2a-P37.2 и условно «уральским» гаплогруппам N3a1, N3a3, N3a4; совокупность остальных гаплогрупп указаны как «прочее»

Положение генофонда Волго-Окского региона среди популяций Центральной России

Наличие у коллектива детальной информации о генофондах коренного населения европейской части России позволяет рассмотреть основные паттерны его изменчивости и оценить, какое место в нем занимает генофонд Волго-Окского региона.

По частотам 35 гаплогрупп Y-хромосомы рассчитана матрица попарных генетических расстояний Нея между 90 популяциями России и Прибалтики и построен график многомерного шкалирования (MDS). В его генетическом пространстве популяции Центральной России образовали три основных кластера (рис. 2): Славянский, Западно-финский, Урало-Поволжский.

Славянский кластер подразделился на два субкластера: в один вошли наиболее северные популяции Центральной России, во второй — основной массив ее популяций.

Субкластер славян, включивший 17 русских популяций центральной и южной России, оказался самым плотным и компактным в генетическом пространстве. Показательно, что к нему чрезвычайно близки и представители западных славян — поляки ($n = 598$) [14]. Это указывает на огромный географический ареал популяций, входящих в центральный славянский субкластер, и на значительное сходство их генофондов. Отличительные черты субкластера — высокие частоты гаплогрупп R1a-CTS1211, R1a-Z92, R1a-M458, I2a-P37.2 и N3a3.

Северный субкластер славян Центральной России объединил пять популяций Костромской, Новгородской и Ярославской областей [4, 8, 9]. Своеобразие его генофонда проявляется в более высоких частотах гаплогрупп E и R1a-M458 и в близости к генофонду финноязычных популяций северо-запада России за счет гаплогрупп I1-M253, I2a-P37.2, N3a4-Z1936, N2-P43, R1a-CTS1211, R1b-L51.

Западно-финский кластер включил все изученные популяции финноязычного населения северо-западной России: вепсов, води, ижоры, карел Карелии, тверских

карел, финнов-ингерманландцев (их соотношение с генофондом Русского Севера описано в [8, 17]). Генофонд кластера сочетает повышение частот гаплогрупп западного (I1-M253, R1b-L51) и уральского (N3a4, N2) происхождения.

Кластер Урало-Поволжья объединил финноязычные и тюркоязычные народы региона. Он занимает самый большой ареал в генетическом пространстве, что указывает на значительные различия генофондов. Расположение популяций на графике не зависит от их языковой принадлежности, а отражает их положение в географическом пространстве. Их генофонды в разных пропорциях сочетают «уральские» гаплогруппы N3a1, N2 и условно «степные» E, G2-P15, J, R1a-Z93, R1b-M73, R1b-Z2105. Важно подчеркнуть две особенности Волго-Окских популяций. Во-первых, популяции Мордовии (эрзя, мокша, шокша) генетически максимально близки к кластеру русских популяций, что подтверждает выводы нашей предыдущей работы о значительном дославянском субстрате в генофонде русских центральной и южной части Европейской России [3]. Во-вторых, к Волго-Окским популяциям генетически близки мишари и чуваша (рис. 3), что требует специального обсуждения.

Геногеографический ландшафт гаплогрупп Y-хромосомы в коренном населении Центральной России

Важнейшая задача исследования — анализ геногеографического ландшафта коренного населения европейской части России, который несет ценную информацию о характере и интенсивности взаимодействия автохтонного населения с пришлыми славянскими племенами.

Не имея возможности привести все 35 карт пространственной изменчивости частот Y-гаплогрупп, мы отобрали шесть наиболее характерных (рис. 4): карты «славянских» (R1a-CTS1211, R1a-M458 и I2a-P37.2) и «уральских» (N3a1, N3a3, N3a4) гаплогрупп. Оба названия очень условны, поскольку сами карты демонстрируют,

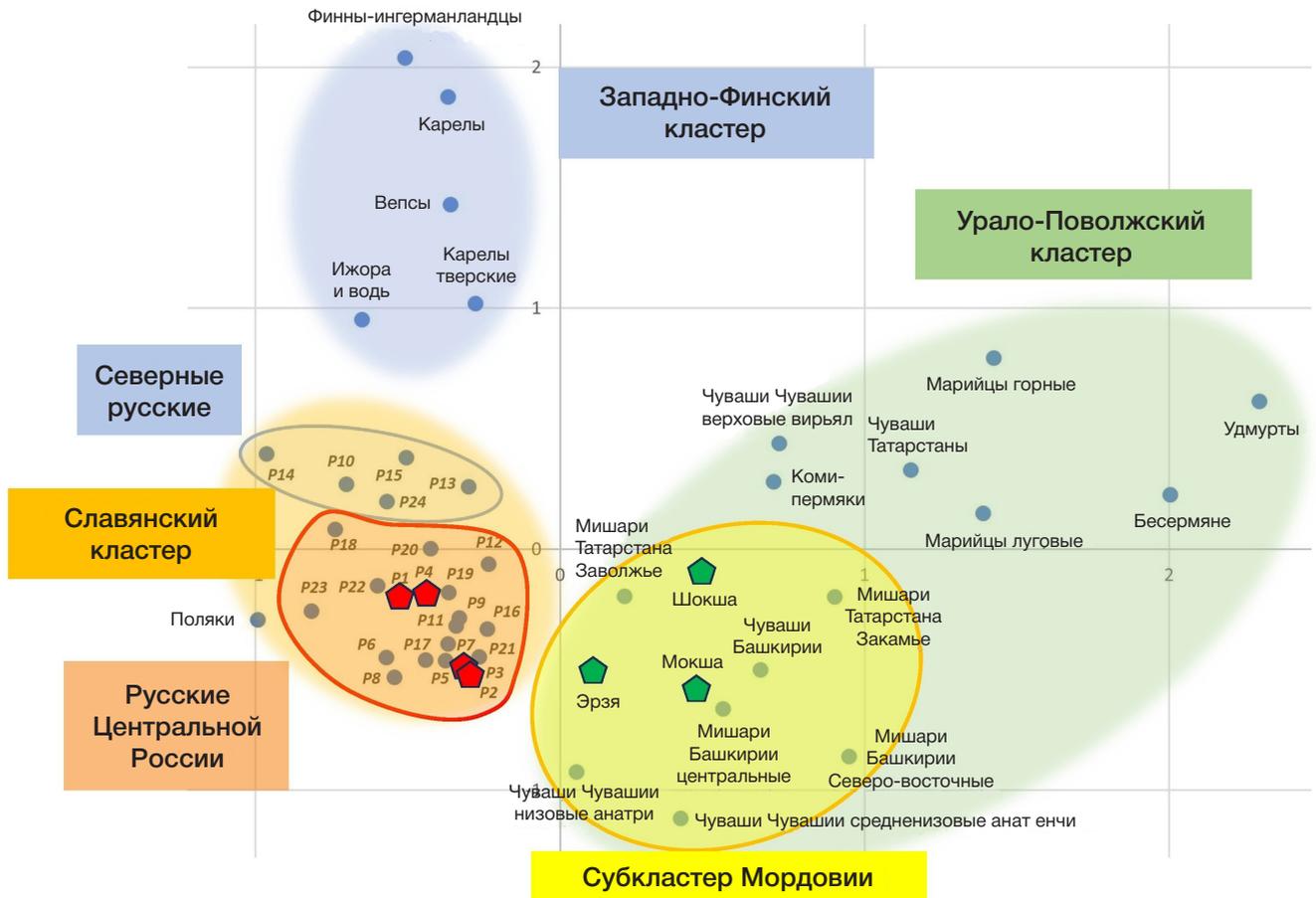


Рис. 2. Положение популяций европейской части России в генетическом пространстве по данным анализа попарных генетических расстояний (коэффициент стресса = 0,16; коэффициент алиенации = 0,17)

сколь обширны их ареалы. Но термин «уральские» включает указание и на лингвистическую принадлежность к уралоязычным народам, и на географический ареал, в том числе и популяций тюркоязычных народов Волго-Уральского региона. На картах приведены границы Рязанской области и Мордовии, позволяющие увидеть место Волго-Окского региона в геногеографическом ландшафте Центральной России.

Гаплогруппа R1a-CTS1211 (рис. 4А) достигает максимальных частот (красные тона) не только у русских Центральной и Южной России, но и у эрзи и мокши Мордовии [3]. Ее средние частоты (желтые тона) охватывают всю периферию карты, за исключением минимумов (зеленые тона) в Казахстане, Удмуртии и северо-западных финнов.

Гаплогруппа R1a-M458 (рис. 4Б) по сравнению с R1a-CTS1211 характерна для более западной части ареала. Максимальные частоты приходятся на популяции северного субкластера графика MDS. Зона низких частот (зеленые тона) доходит до Мордовии и Марий-Эл.

Гаплогруппа I2a-P37.2 (рис. 4В) при такой же средней частоте геногеографического ландшафта ($0,07 \leq q \leq 0,08$), что и R1a-M458, отличается большим размахом частот, более резкими границами переходов и расположением максимальных частот на юго-западе европейской части России.

Гаплогруппа N3a1 (рис. 4Г) как истинно «уральская» почти альтернативна предыдущей карте «славянской» I2a-P37.2. Абсолютный максимум (65%) находится на северо-востоке в Удмуртии, граница средних частот охватывает Мордовию (с локальным максимумом у шокши),

но русские популяции уже находятся в зоне низких частот (зеленые тона).

Гаплогруппа N3a3 (рис. 4Д) традиционно относится к «уральским», поскольку характерна для уралоязычных народов северо-запада. Максимум частоты находится в Прибалтике (28–58%), Фенноскандии и соседних регионах Русского Севера [18], но локальный максимум обнаруживается также в Поволжье у марийцев (15%). Со средними частотами N3a3 распространена почти по всей европейской части России, что отражает древние «балтские» влияния.

Гаплогруппу N3a4 (рис. 4Е) отличает четкий градиент падения частоты с севера на юг. Ее максимумы сосредоточены в Фенноскандии [15], но очень высокие частоты (до 60%) у северо-западных финноязычных народов России и на Русском Севере. При этом зона средних частот (желтые тона) тянется на юг до Рязани и на восток до предгорьев Урала (у башкир 17% N3a4).

Положение генофонда Волго-Окского региона в геногеографическом ландшафте Центральной России

Наглядную оценку генетического сходства Волго-Окского региона с разными популяциями европейской части России дают карты генетических расстояний Нея (d_{Nei}) (рис. 5).

Генетические расстояния от русских Рязанской области (в среднем по семи районам; рис. 5А) подтверждают выявленное (MDS; рис. 2) их сходство с генофондами практически всех русских популяций Центральной России (зеленые тона). Зеленое пятно максимального сходства

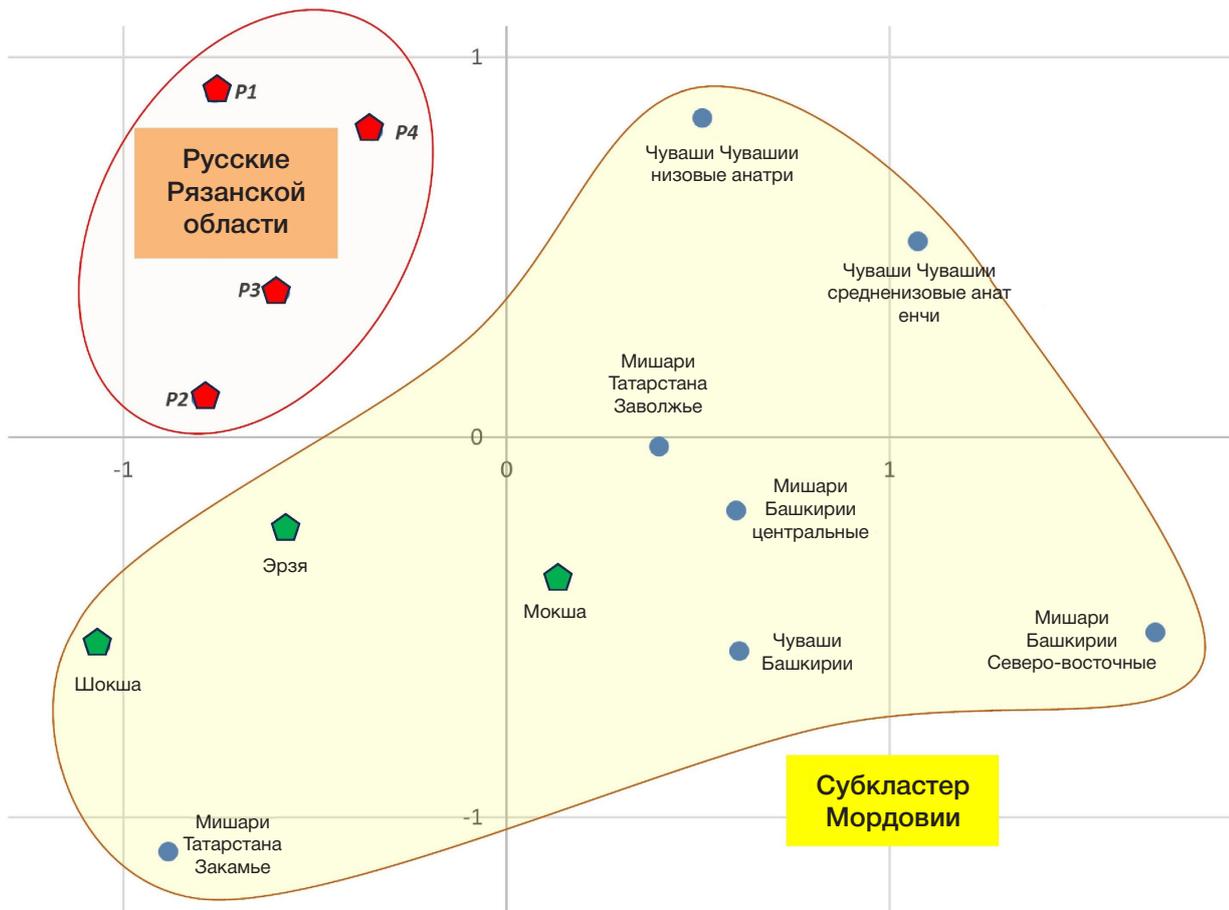


Рис. 3. Положение популяций Славянского и Урало-поволжского кластеров относительно друг друга по данным анализа попарных генетических расстояний (коэффициент стресса = 0,09; коэффициент алиенации = 0,13)

обнаруживается и в Мордовии у эрзян. Область средних генетических расстояний (сиренево-голубые тона) охватывает и северные русские популяции, и восточных славян, и все правобережье Волги.

Но удивителен паттерн генетических расстояний от эрзи (рис. 5Б): «зеленая» зона высокого сходства охватывает только русские популяции, доходя до Калужской и Курской областей. «Сиреневая» зона средних значений еще шире — она доходит до Белгородской, Брянской, Нижегородской областей, но из уральских популяций включает только мишарей Закамья (Алексеевский, Алькеевский, Спасский, Чистопольский районы Татарстана).

Выше было отмечено своеобразие Y-генофонда мокши — оно проявилось в отсутствии популяций, находящихся от мокши на малом генетическом расстоянии (рис. 5В). Но область средних расстояний довольно обширна: помимо эрзи и шокши она включает мишарей Башкирии и Заволжья (Дрожжановский, Апастовский районы Татарстана), чувашей Башкирии, чувашей анатри Чувашии. Все эти популяции располагаются в субкластере Мордовии на графике (MDS, рис. 3). Генофонд шокши (рис. 5Г) оказался наиболее близок к мишарям Закамья и луговым марийцам.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ всех славянских популяций [1] показал хорошую корреляцию данных по аутосомному геному и по Y-хромосоме. Такая связь подтверждается в более ранней работе: замещение аутосомного генофонда в процессе славянской экспансии сопровождалось не менее резкой сменой гаплогрупп Y-хромосомы, приведшей к

доминированию гаплогрупп R1a-CTS1211, R1a-M458 и I2a-P37.2 [2].

Поэтому в данной работе особое внимание уделено геногеографическому ландшафту условно «славянских» гаплогрупп. Суммарная частота гаплогрупп R1a-CTS1211, R1a-Z92, R1a-M458, R1a-M198* и I2a-P37.2, рассчитанная по совокупности 19 популяций русских и 15 популяций белорусов и украинцев, составила 67% генофонда восточных славян. Этот показатель полностью вторит суммарной частоте этих «славянских» гаплогрупп у русских центральной России (66%) и в 3 раза выше, чем у финноязычных и тюркоязычных народов Волго-Уральского региона (21%). Однако в популяциях Мордовии этот показатель в 2 раза выше (42%), чем в регионе (21%).

Детальное филогенетическое изучение современных и древних носителей гаплогрупп R1a-CTS1211 и R1a-Z92 в Волго-Окском регионе показало, что на восточной периферии славянской экспансии (Рязанская область) около половины линий гаплогрупп R1a-CTS1211 и R1a-Z92 имеют дославянское происхождение [3]. Частота этих двух гаплогрупп у русских восточных районов Рязанской области (46%) соответствует их частоте во всех русских популяциях центральной России (46%). Это позволяет нам распространить на все популяции русских этого обширного региона нижнюю оценку вклада дославянского населения в Y-хромосомный генофонд русских центральной и южной России: он составляет около 43%. Эта оценка указывает именно на нижнюю планку вклада автохтонного населения в славянский генофонд, поскольку получена именно для гаплогрупп, наиболее характерных для славян. Последующее детальное филогенетическое исследование

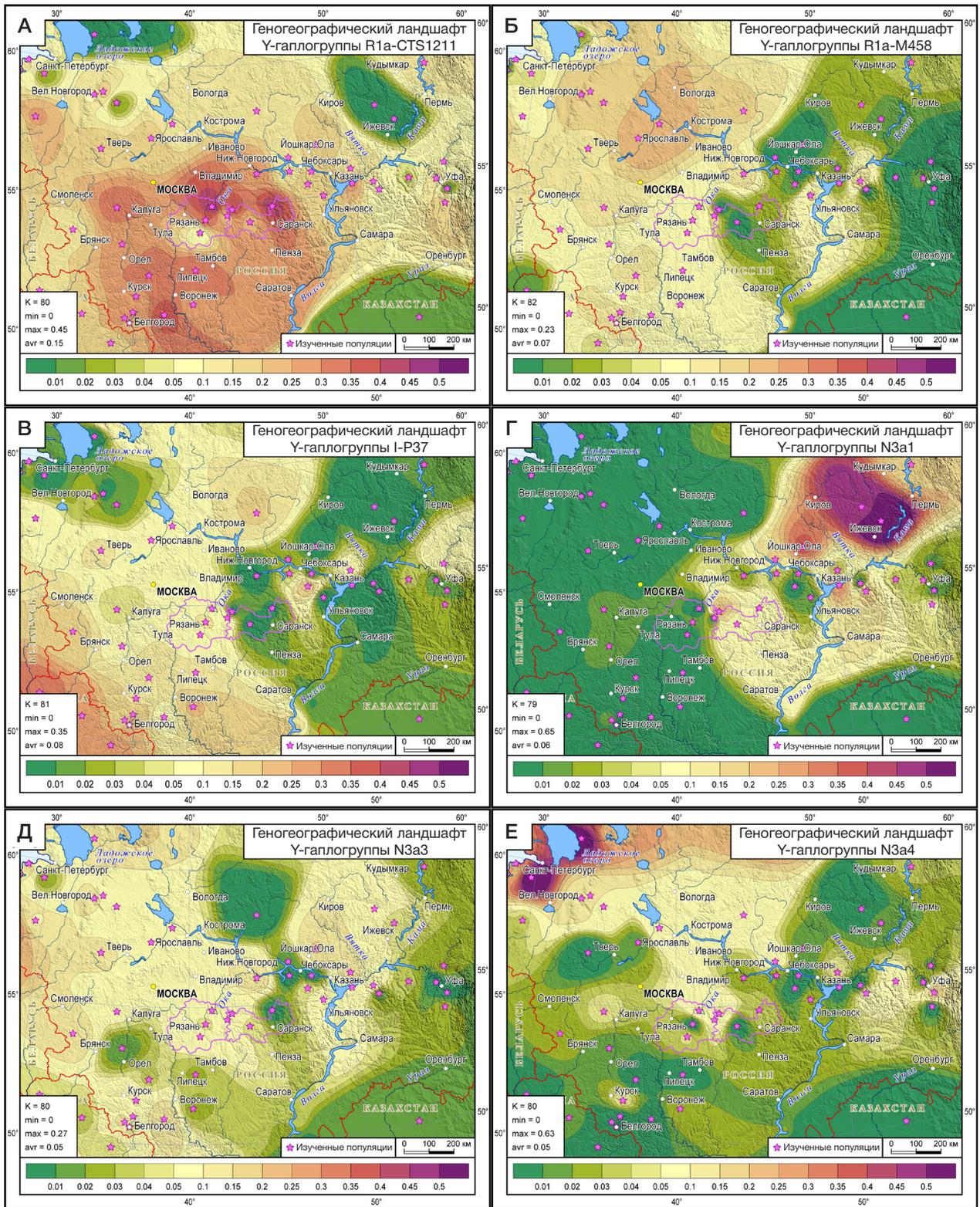


Рис. 4. Географическое распространение и частота встречаемости основных гаплогрупп коренного населения европейской части России: гаплогруппы R1a-CTS1211 (А); гаплогруппы R1a-M458 (Б); гаплогруппы I-P37 (В); гаплогруппы N3a1 (Г); гаплогруппы N3a3 (Д); гаплогруппы N3a4 (Е). Зеленые тона отражают минимальные частоты встречаемости гаплогруппы; желтые тона — средние частоты; оранжевые и красные — максимальные частоты

современных и древних носителей «уральских» гаплогрупп в Волго-Окском регионе покажет, насколько оценка вклада дославянского населения в русский генофонд может оказаться еще выше.

Из условно «уральских» гаплогрупп наиболее распространенными в Волго-Окском регионе оказались гаплогруппы N3a1, N3a3 и N3a4. Но вновь подчеркнем,

что наименование «уральские» является в данном случае и географическим, и лингвистическим, и указывает на распространение этих гаплогрупп как у изученных народов, говорящих на языках уральской языковой семьи (и северо-западных — вепсы, водь, ижора, карелы, финны-ингерманландцы; и восточных — бесермяне, марийцы, мокша, удмурты, шокша, эрзя), так и у рассмотренных

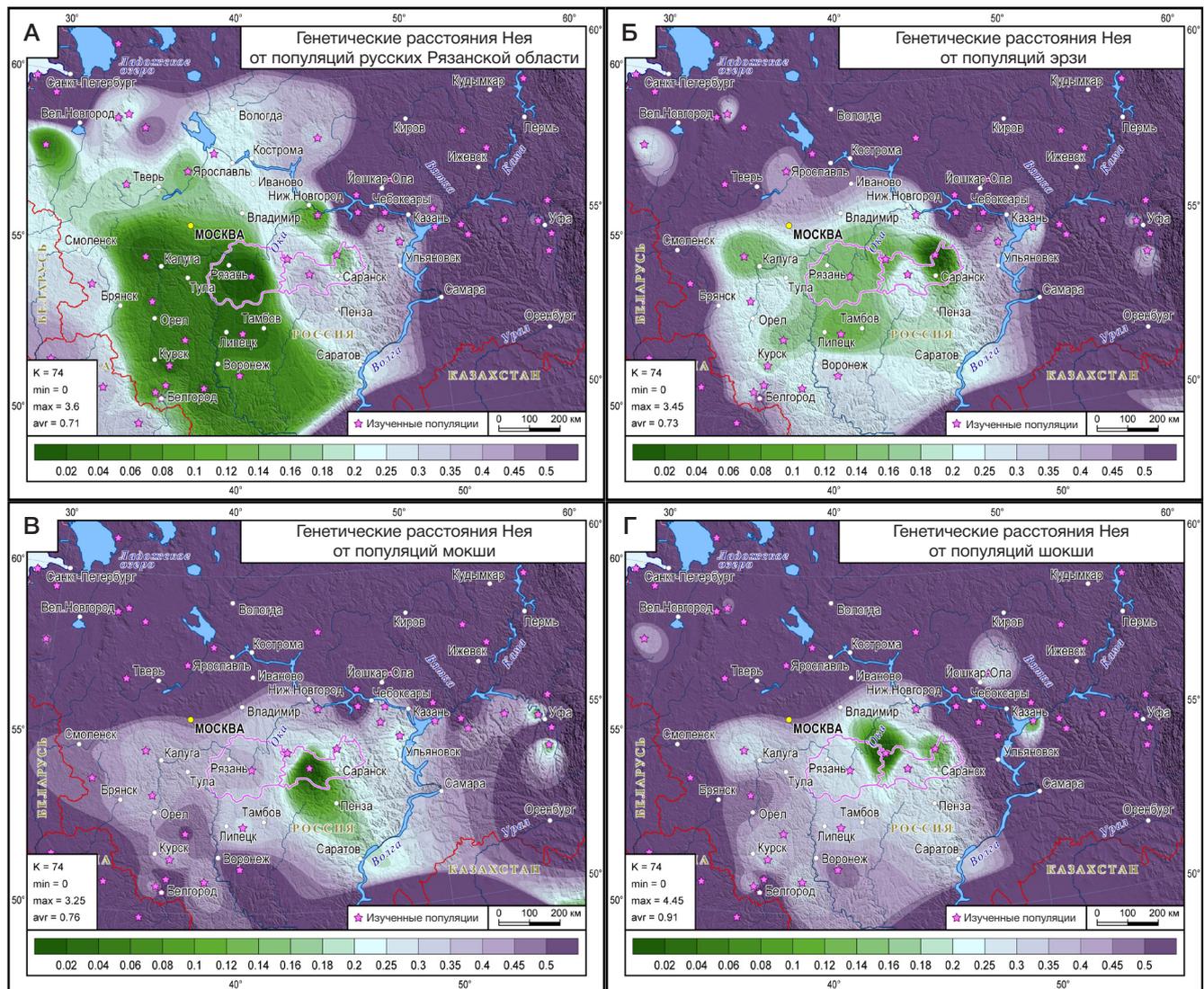


Рис. 5. Карты генетических расстояний Нея от исследуемых популяций Волго-Окского региона: от суммарной выборки русских популяций Рязанской области (А); от популяций эрзя (Б); от популяций мокши (В); от популяций шокши (Г). Зеленые тона отражают минимальные генетические расстояния (наибольшее сходство генофондов); сиренево-голубые тона — средние генетические расстояния; фиолетовые тона — максимальные генетические расстояния (значительные различия генофондов)

тюркоязычных популяций Волго-Уральского региона (башкиры, татары казанские, кряшены, мишари, чуваш). Суммарные частоты «уральских» гаплогрупп N3a1, N3a3 и N3a4 в этих трех группах популяций распределились в таком порядке убывания: северо-западные финноязычные народы (48%), восточные финноязычные народы (37%), турки Волго-Уралья (12%). Популяции Мордовии (23%) по совокупности «уральских» гаплогрупп занимают промежуточное положение в Волго-Уральском регионе, приближаясь по этому показателю к русским Рязанской области (11%) и русским популяциям Центральной России в целом (11%).

Важным результатом анализа геногеографического ландшафта Центральной России оказалось впервые обнаруженное «родство» Y-генофондов популяций Мордовии, всех четырех исследованных нами популяций мишарей Татарстана и Башкирии и большинства популяций чувашей (анатри, анат енчи и чуваш Башкирии). Все эти генофонды массива финноязычных и тюркоязычных популяций формируют общий субкластер, который указывает на их близкое генетическое родство. В генетическом пространстве этот субкластер оказался

близок к русским не только рязанским, но и всему массиву русских популяций Центральной и Южной России, а также по соотношению «славянских» (35%) и «уральских» (14%) гаплогрупп.

Тот факт, что все популяции Мордовии вместе с мишарями и чувашами образуют единый генетический массив, позволяет выдвинуть гипотезу, что все популяции этого кластера восходят к общему древнему финноязычному населению региона. Источник этой общности может быть различным. Он может восходить к именковской археологической культуре раннего средневековья и быть связан с миграциями древних балтов [19–21]. Но стоит еще раз проверить и «мещерскую» гипотезу происхождения мишарей. По данным антропологии [22] мишари ближе к эрзянам, чем к мещере, но новые сведения по Y-генофонду указывают на то, что не только эрзя и мишари, но и все популяции Мордовии вместе с мишарями и чувашами образуют единый генетический массив, который может восходить к общности племен, в которую до славянской экспансии входила мещера вместе с родственными ей племенами. Проверка этих гипотез возможна на основе более детального изучения их генофондов по широкой

панели Y-STR маркеров [3] и анализа предковых компонент ADMIXTURE аутосомного генофонда.

Выводы

1. Итоги геногеографического анализа изменчивости 35 гаплогрупп Y-хромосомы в 80 популяциях коренного народонаселения Центральной России (собственные данные) и 10 популяциях стран Северной Европы [13–15] представлены в виде графиков многомерного шкалирования и серии карт геногеографического ландшафта. 2. Показано, что генофонд русских популяций Волго-Окского региона (семь районов Рязанской области) полностью вписан в компактный кластер популяций Центральной России и принадлежит

общему генофонду восточных и западных славян. Карта генетических расстояний от русских Рязанской области до всех изученных популяций коренного народонаселения Центральной России полностью подтвердила этот вывод. 3. Генофонд финноязычных популяций Волго-Окского региона (мокша, эрзя, шокша) принадлежит обширному кластеру Волго-Уральских популяций, но максимально генетически близок к русским популяциям Центральной России. 4. Выявлено, что в субкластер, близкий русскому генофонду, входят вместе с популяциями Мордовии большинство популяций чувашей и все изученные популяции мишарей Татарстана и Башкирии. Выдвинута гипотеза, что этот массив финноязычных и тюркоязычных популяций восходит к генофонду древнего автохтонного финноязычного населения Волго-Окского региона.

Литература

1. Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M, Agdzhoyan A, Dibirova K, Uktvertye I, et al. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: a synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data. *PLoS ONE*. 2015; 10 (9): e0135820.
2. Gretzinger J, Biermann F, Mager H, King B, Zlámálová D, Traverso L, et al. Ancient DNA connects large-scale migration with the spread of Slavs. *Nature*. 2025. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09437-6>.
3. Adamov D, Shlykov A, Potanina A, Voronina M, Gorin I, Ponomarev G., et al. Pre-Slavic and Slavic Interaction at Eastern Periphery of Slavic Expansion in Northeastern Europe (Y-Gene Pools of Volga-Oka Region). *Genes*. 2025; 16 (10): 1149.
4. Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, Evseeva I, et al. Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. *American Journal of Human Genetics*. 2008; 82 (1): 236–50.
5. Балановская Е. В., Балановский О. П. Русский генофонд на Русской равнине. М.: Луч, 2007; 416 с.
6. Окованцев В. С., Пономарев Г. Ю., Агджоян А. Т., Агджоян А. Т., Пылёв В. Ю., Балановская Е. В. Своеобразие поморков Онежского полуострова и Зимнего берега в генетическом контексте севера Европы. *Вестник Московского университета. Серия 23: Антропология*. 2022; 5: 5–14.
7. Балановская Е. В., Пежемский Д. В., Романов А. Г., Баранова Е. Е., Ромашкина М. В., Агджоян А. Т. и др. Генофонд Русского Севера: славяне? финны? палеоевропейцы? *Вестник Московского университета. Серия 23: Антропология*. 2011; 3: 27–58.
8. Балановская Е. В., Агджоян А. Т., Схаляхо Р. А., Балаганская О. А., Фрейдин Г. С., Черневский К. Г. и др. Генофонд новгородцев: между севером и югом. *Генетика*. 2017; 53: 1259–71.
9. Чухряева М. И., Павлова Е. С., Напольских В. В., Гарин Э. В., Клопов А. С., Темняткин С. Н. и др. Сохранились ли следы финно-угорского влияния в генофонде русского населения Ярославской области? *Свидетельства Y-хромосомы. Генетика*. 2017; 53: 388–99.
10. Балановская Е. В., Горин И. О., Пономарев Г. Ю., Пылёв В. Ю., Петрущенко В. С., Маркина Н. В. и др. Следы взаимодействия финноязычного, славянского и тюркоязычного населения в современном генофонде и их отражение в фармакогенетике. *Вестник РГМУ*. 2022; №2: 18–27.
11. Peltola S, Majander K, Makarov N, Dobrovolskaya M, Nordqvist K, Salmela E, et al. Genetic admixture and language shift in the medieval Volga-Oka interfluvium. *Current Biology*. 2023; 33 (1): 174–82.
12. Балановская Е. В., Жабагин М. К., Агджоян А. Т., Чухряева М. И., Маркина Н. В., Балаганская О. А. и др. Популяционные биобанки: принципы организации и перспективы применения в геногеографии и персонализированной медицине. *Генетика*. 2016; 52 (12): 1371–87.
13. Ilumäe AM, Post H, Flores R, Karmin M, Sahakyan H, Mondal M, et al. Phylogenetic history of patrilineages rare in northern and eastern Europe from large-scale re-sequencing of human Y-chromosomes. *Eur J Hum Genet*. 2021; 29: 1510–19. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00897-8>.
14. Milewski M, Dawidziuk M. Most males in modern Poland carry Y-chromosomal lineages from clades that have recently expanded over Central, Eastern and SouthEastern Europe. *Human Genetics*. 2025; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-025-02781-7>.
15. Preussner A, Leinonen J, Riikonen J, Pirinen M, Tukiainen T. Y chromosome sequencing data suggest dual paths of haplogroup N1a1 into Finland. *Eur J Hum Genet*. 2025; 33: 89–97. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41431-024-01707-7>.
16. Кошель С. М. Геоинформационные технологии в геногеографии. В книге: И. К. Лурье, В. И. Кравцова, редакторы. *Современная географическая картография*. М.: Дата+, 2012; с. 158–66.
17. Agdzhoyan A, Ponomarev G, Pylev V, (Kagazezheva) Zh, Gorin I, Evsyukov I, et al. The Finnic Peoples of Russia: Genetic Structure Inferred from Genome-Wide and Y-Chromosome Data. *Genes*. 2024; 15: 1610. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes15121610>.
18. Ilumäe A M, Reidla M, Chukhryaeva M, Järve M, Post H, Karmin M, et al. Human Y Chromosome Haplogroup N: A Non-trivial TimeResolved Phylogeography that Cuts across Language Families. *The American Journal of Human Genetics*. 2016; 99 (1): 163–73.
19. Матвеева Г. И. О происхождении именованной культуры. Древние и средневековые культуры Поволжья. Куйбышев, 1981.
20. Седов В. В. *Очерки по археологии славян*. Москва. 128 с, 1994.
21. Напольских В. В. Балто-славянский языковой компонент в Нижнем Прикамье в сер. I тыс. н. э. *Славяноведение*. 2006; 2: 3–19.
22. Алексеева Т. И., Васильев Б. А. К вопросу о генетическом родстве русской мещеры и татар-мишарей. *Краткие сообщения Института этнографии*. 1959; 31: 3–13.

References

1. Kushniarevich A, Utevska O, Chuhryaeva M, Agdzhoyan A, Dibirova K, Uktveryte I, et al. Genetic heritage of the Balto-Slavic speaking populations: a synthesis of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal data. *PLoS ONE*. 2015; 10 (9): e0135820.
2. Gretzinger J, Biermann F, Mager H, King B, Zlámálová D, Traverso L, et al. Ancient DNA connects large-scale migration with the spread of Slavs. *Nature*. 2025. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09437-6>.
3. Adamov D, Shlykov A, Potanina A, Voronina M, Gorin I, Ponomarev G., et al. Pre-Slavic and Slavic Interaction at Eastern Periphery of Slavic Expansion in Northeastern Europe (Y-Gene Pools of Volga-Oka Region). *Genes*. 2025; 16 (10): 1149.
4. Balanovsky O, Rootsi S, Pshenichnov A, Kivisild T, Churnosov M, Evseeva I, et al. Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context. *American Journal of Human Genetics*. 2008; 82 (1): 236–50.
5. Balanovska EV, Balanovsky OP. *Russkij genofond na Russkij ravnine*. M.: Luch, 2007; 416 s. Russian.
6. Okovancev VS, Ponomarev GYu, Agdzhoyan AT, Agdzhoyan AT, Pylyov VYu, Balanovska EV. Svoeobrazie pomorov Onezhskogo poluoostrova i Zimnego berega v geneticheskom kontekste severa Evropy. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23: Antropologiya*. 2022; 5: 5–14. Russian.
7. Balanovska EV, Pezhemskij DV, Romanov AG, Baranova EE, Romashkina MV, Agdzhoyan AT i dr. Genofond Russkogo Severa: slavyane? finny? paleoevropejcy? *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23: Antropologiya*. 2011; 3: 27–58. Russian.
8. Balanovska EV, Agdzhoyan AT, Skhalyaho RA, Balaganska OA, Frejdin GS, Cherevskij KG i dr. Genofond novgorodcev: mezhdju severom i yugom. *Genetika*. 2017; 53: 1259–71. Russian.
9. Chuhryaeva MI, Pavlova ES, Napolskih VV, Garin EV, Klopov AS, Temnyatkin SN i dr. Sohranilis' li sledy finno-ugorskogo vliyaniya v genofonde russkogo naseleniya YAroslavskoj oblasti? Svidetel'stva Y-hromosomy. *Genetika*. 2017; 53: 388–99. Russian.
10. Balanovska EV, Gorin IO, Ponomarev GYu, Pylyov VYu, Petrushenko VS, Markina NV i dr. Sledy vzaimodejstviya finnoyazychnogo, slavyanskogo i tyurkoyazychnogo naseleniya v sovremennom genofonde i ih otrazhenie v farmakogenetike. *Vestnik RGMU*. 2022; №2: 18–27. Russian.
11. Peltola S, Majander K, Makarov N, Dobrovolskaya M, Nordqvist K, Salmela E, et al. Genetic admixture and language shift in the medieval Volga-Oka interfluve. *Current Biology*. 2023; 33 (1): 174–82.
12. Balanovska EV, Zhabagin MK, Agdzhoyan AT, Chuhryaeva MI, Markina NV, Balaganskaya OA i dr. Populyacionnye biobanki: principy organizacii i perspektivy primeneniya v genogeografii i personalizirovannoj medicine. *Genetika*. 2016; 52 (12): 1371–87. Russian.
13. Ilumäe AM, Post H, Flores R, Karmin M, Sahakyan H, Mondal M, et al. Phylogenetic history of patrilineages rare in northern and eastern Europe from large-scale re-sequencing of human Y-chromosomes. *Eur J Hum Genet*. 2021; 29: 1510–19. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41431-021-00897-8>.
14. Milewski M, Dawidziuk M. Most males in modern Poland carry Y-chromosomal lineages from clades that have recently expanded over Central, Eastern and SouthEastern Europe. *Human Genetics*. 2025; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-025-02781-7>.
15. Preussner A, Leinonen J, Riikonen J, Pirinen M, Tukiainen T. Y chromosome sequencing data suggest dual paths of haplogroup N1a1 into Finland. *Eur J Hum Genet*. 2025; 33: 89–97. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41431-024-01707-7>.
16. Koshel SM. Geoinformacionnye tekhnologii v genogeografii. V knige: I. K. Lur'e, V. I. Kravcova, redaktory. *Sovremennaya geograficheskaya kartografiya*. M.: Data+, 2012; s. 158–66. Russian.
17. Agdzhoyan A, Ponomarev G, Pylev V, (Kagazezheva) Zh, Gorin I, Evsyukov I, et al. The Finnic Peoples of Russia: Genetic Structure Inferred from Genome-Wide and Y-Chromosome Data. *Genes*. 2024; 15: 1610. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes15121610>.
18. Ilumäe A M, Reidla M, Chukhryaeva M, Järve M, Post H, Karmin M, et al. Human Y Chromosome Haplogroup N: A Non-trivial TimeResolved Phylogeography that Cuts across Language Families. *The American Journal of Human Genetics*. 2016; 99 (1): 163–73.
19. Matveeva GI. O proiskhozhdenii imen'kovskoj kul'tury. *Drevnie i srednevekoveye kul'tury Povolzh'ya*. Kujbyshev, 1981. Russian.
20. Sedov VV. *Ocherki po arheologii slavyan*. Moskva. 1994. 128 s. Russian.
21. Napolskih VV. Balto-slavyanskij yazykovoj komponent v Nizhnem Prikam'e v ser. I tys. n. e. *Slavyanovedenie*. 2006; 2: 3–19. Russian.
22. Alekseeva TI, Vasilev BA. K voprosu o geneticheskom rodstve russkoj meshchery i tatar-misharej. *Kratkie soobshcheniya Instituta etnografii*. 1959; 31: 3–13. Russian.

ТРАНСКРИПЦИОННАЯ КИНАЗА CDK8, НО НЕ CDK19 СПОСОБСТВУЕТ РАЗВИТИЮ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ У МЫШЕЙ

А. Н. Незнамов^{1,2}, Ю. П. Байкова¹, Е. Н. Коршунов¹, Е. М. Исаева¹, А. В. Брутер¹, М. В. Кубекина¹✉

¹ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Атеросклероз, являющийся основной причиной инфаркта миокарда и инсульта, остается глобальной медико-социальной проблемой. Несмотря на его признание в качестве хронического воспалительного заболевания, внутриклеточные молекулярные механизмы, управляющие прогрессированием болезни, изучены недостаточно. Циклин-зависимые киназы CDK8 и CDK19, являющиеся ключевыми регуляторами транскрипции и воспаления, потенциально могут играть значительную роль в патогенезе атеросклероза. Целью исследования было изучить влияние нокаута генов *Cdk8* и *Cdk19* на развитие атеросклеротических поражений у мышей с дефицитом аполипопротеина E (*ApoE^{-/-}*). Показано, что как эндотелиоспецифичный, так и системный нокаут *Cdk8* достоверно снижает площадь атеросклеротических поражений аорты, причем тотальный нокаут оказывает более выраженный антиатерогенный эффект. Это свидетельствует о плейотропной роли CDK8 в патогенезе атеросклероза, опосредованной его функцией не только в эндотелиальных клетках, но и, вероятно, в макрофагах. В отличие от *Cdk8*, системный нокаут *Cdk19* не оказал значимого влияния на развитие атеросклероза. Таким образом, CDK8, но не CDK19, идентифицирован в качестве проатерогенного регулятора, что делает его перспективной мишенью для разработки новых терапевтических стратегий.

Ключевые слова: атеросклероз, генетически модифицированные животные, транскрипционные киназы CDK8 и CDK19, атеросклеротические поражения, аполипопротеин E

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № (24-25-00384), <https://rscf.ru/project/24-25-00384/>.

Вклад авторов: А. Н. Незнамов — генотипирование животных, обработка изображений аорт, написание рукописи; Ю. П. Байкова — сепарация и окрашивание аорт, подготовка препаратов; Е. Н. Коршунов, Е. М. Исаева — работа с животными, подготовка экспериментальных групп; А. В. Брутер — предоставление антител для вестерн-блота, анализ литературы, анализ результатов; М. В. Кубекина — анализ литературы, планирование исследования, проведение вестерн-блота, анализ результатов, написание рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол № 25 от 15 мая 2024 г.) и проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

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

Статья получена: 31.10.2025 **Статья принята к печати:** 01.12.2025 **Опубликована онлайн:** 16.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.078

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/>).

TRANSCRIPTIONAL KINASE CDK8, BUT NOT CDK19, PROMOTES THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROTIC LESIONS IN MICE

Neznamov AN^{1,2}, Baykova YuP¹, Korshunov EN¹, Isaeva EM¹, Bruter AV¹, Kubekina MV¹✉

¹ Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Atherosclerosis, being the main cause of myocardial infarction and stroke, remains a global medical and social problem. Despite the fact that it is recognized as a chronic inflammatory disorder, the intracellular molecular mechanisms that drive the disease progression are poorly understood. The CDK8 and CDK19 cyclin-dependent kinases being the key regulators of transcription and inflammation can potentially play an important role in the atherosclerosis pathogenesis. The study aimed to assess the impact of the *Cdk8* and *Cdk19* gene knockout on the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice (*ApoE^{-/-}*). It has been shown that both endothelium-specific and systemic *Cdk8* knockout significantly reduce the area of atherosclerotic aortic lesions, and the total knockout has a more prominent anti-atherogenic effect. This suggests a pleiotropic role of CDK8 in the atherosclerosis pathogenesis mediated by its function not only in endothelial cells, but probably also in macrophages. In contrast to *Cdk8*, the systemic *Cdk19* knockout had no significant effect on the development of atherosclerosis. Thus, CDK8, but not CDK19, has been identified as a pro-atherogenic regulator, which makes it a promising target for the development of novel therapeutic strategies.

Keywords: atherosclerosis, genetically modified animals, transcriptional kinases CDK8 and CDK19, atherosclerotic lesions, apolipoprotein E

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. (24-25-00384), <https://rscf.ru/project/24-25-00384/>.

Author contribution: Neznamov AN — genotyping of animals, aortic image processing, manuscript writing; Baykova YuP — aorta separation and staining, preparation of specimens; Korshunov EN, Isaeva EM — animal handling, preparation of experimental groups; Bruter AV — providing antibodies for the Western blot assay, literature review, analysis of the results; Kubekina MV — literature review, study planning, Western blot assay, analysis of the results, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Gene Biology RAS (protocol No. 25 dated 15 may 2024), it was strictly compliant with the provisions of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

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

Received: 31.10.2025 **Accepted:** 01.12.2025 **Published online:** 16.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.078

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/>).

Инфаркт миокарда и инсульт, являющиеся основными осложнениями атеросклероза, по данным Всемирной организации здравоохранения, остаются ведущими причинами смертности в мире. В России на долю болезней системы кровообращения в 2019 г. пришлось 46,8% всех случаев смерти. Высокие показатели летальности во многом обусловлены длительным бессимптомным развитием атеросклероза, который на поздних, диагностируемых стадиях часто требует хирургического вмешательства и слабо поддается консервативной терапии [1]. Несмотря на существующие методы лечения, направленные на снижение уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) и восстановление кровотока, атеросклероз продолжает оставаться глобальной медико-социальной проблемой. Общеизвестно, что атеросклероз является хроническим воспалительным заболеванием артерий [2], однако внутриклеточные молекулярные механизмы, управляющие этим воспалением и прогрессированием болезни, изучены недостаточно [3]. Ключевым событием в его патогенезе является формирование атеросклеротических бляшек, характеризующееся хроническим воспалением, дисфункцией эндотелия, накоплением липидов и пролиферацией гладкомышечных клеток в стенке [4, 5].

Циклин-зависимые киназы CDK8 и CDK19, входящие в состав медиаторного комплекса, являются ключевыми регуляторами транскрипции, опосредованной РНК-полимеразой II. Хотя их точные механизмы действия остаются не до конца изученными, известно, что CDK8/19 играют центральную роль в транскрипционном перепрограммировании, лежащем в основе клеточной дифференцировки и патогенеза различных заболеваний [6]. CDK8/19 выступают модуляторами сигнальных путей транскрипционных факторов STAT1 и NF- κ B, играющих критическую роль в воспалительных процессах [7, 8].

В последнее время накапливаются данные, связывающие CDK8 с патологиями сердечно-сосудистой системы. В частности, CDK8 выступает корегулятором транскрипционного фактора HIF-1 α (индуцируемый гипоксией фактор-1 α) — ключевого медиатора клеточного ответа на гипоксию, который вносит значительный вклад в развитие атеросклероза [9]. HIF-1 α запускает экспрессию широкого спектра генов, непосредственно способствующих развитию атеросклероза, таких как TNF, CD36, VEGF, ICAM-1, VCAM-1 [10–12]. Таким образом, HIF-1 α опосредует проатерогенные процессы, такие как нарушение метаболизма липидов в макрофагах, дисфункция эндотелия и усиление воспаления [13]. Кроме того, CDK8 является негативным регулятором биосинтеза липидов. CDK8 индуцирует повышенное убиквитинирование и деградацию SREBP посредством фосфорилирования этого белка. Семейство SREBP включает ключевые факторы транскрипции, регулирующие липидный обмен, в том числе транскрипцию генов синтеза холестерина и липогенеза [14]. Поскольку CDK8 регулирует экспрессию множества генов, ассоциированных с атерогенезом, выдвинута гипотеза о том, что делеция CDK8 и/или CDK19 может привести к снижению прогрессии атеросклероза в результате снижения липопротеиновой инфильтрации интимы аорты.

Несмотря на известное участие CDK8/19 в канцерогенезе и в иммунном ответе [15, 16], их роль в атерогенезе изучена недостаточно. В связи с этим представляется перспективным исследовать роль транскрипционных киназ CDK8/19 — известных регуляторов воспаления и участников кардиоваскулярных патологий — в развитии атеросклероза. Таким образом, цель данного исследования —

оценить влияние системного и эндотелиоспецифичного нокаута *Cdk8*, а также системного нокаута *Cdk19* на формирование атеросклеротических поражений в аорте мыши на фоне нокаута *ApoE* — известной модели атеросклероза у мышей [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

В работе использовали мышей активаторных линий Rosa26/Cre-ERT2 (B6.129-Gt(ROSA)26Sortm1(cre/ERT2)Tyj/J, Jackson Laboratory) и Tie2-Cre (B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J, Jackson Laboratory). Мыши данных линий были скрещены с *Cdk8fl/fl* (Jax:008463, Jackson Laboratory) с фланкированным loxP-сайтами экзоном 2 в гене *Cdk8* для получения Rosa26/Cre-ERT2/*Cdk8fl/fl* (системный нокаут) и Tie2-Cre/*Cdk8fl/fl* (эндотелиоспецифичный нокаут). Кроме того, использовали мышей линии C57BL/6N-*Cdk19* (RRID:MMRRC_047035-UCD, MMRRC) с конститутивным нокаутом гена *Cdk19*. Генотипирование потомства линий *Cdk8fl/fl*, C57BL/6N-*Cdk19*, Rosa26/Cre-ERT2 проводили как описано ранее [18]. Эксперименты проводили на мышах перечисленных линий на фоне *ApoE*^{-/-} (нокаута аполипопротеина E). Данные мыши были получены в дар от Юрия Котелевцева [19]. Для генотипирования мышей линий *ApoE*^{-/-} и Tie2-Cre использовали олигонуклеотидные праймеры P1, P2 и P3 а также P4, P5 и P6 соответственно (таблица). Все праймеры были синтезированы в компании «Евроген» (Россия).

Мышей содержали в виварии ЦКП ИБГ РАН в условиях постоянного доступа к воде и корму. Световой цикл составлял 12/12 ч, температура воздуха — 23 ± 1 °C, влажность — 42 ± 5%. Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации шейных позвонков.

Индукция нокаута гена *Cdk8*

Для индукции нокаута гена *Cdk8* у мышей линии Rosa26/Cre-ERT2/*Cdk8fl/fl* проводили внутрибрюшинные инъекции тамоксифена (Sigma-Aldrich, США), растворенного в кукурузном масле (Sigma-Aldrich, США), как описано ранее [20]: самцам в возрасте 2 месяца ежедневно вводили по 0,15 мл тамоксифена в концентрации 20 мг/мл в течение 7 дней подряд. Данные мышей переводили на атерогенную диету (Western type diet, WTD) через месяц после индукции нокаута.

Экспериментальные группы

Из самцов мышей представленных линий возрастом 3 месяца сформировали следующие экспериментальные группы (рис. 1), всего 46 животных.

1. *ApoE* — мыши с дефицитом аполипопротеина E, содержащиеся на стандартном корме (отрицательный контроль), $n = 4$.

2. *ApoE* WTD — мыши *ApoE*^{-/-}, содержащиеся на WTD (положительный контроль модели атеросклероза для мышей *Cdk19*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} и Tie2-Cre/*Cdk8fl/fl*/*ApoE*^{-/-}), $n = 8$.

3. *ApoE* + Oil WTD — мыши *ApoE*^{-/-}, обработанные в течение 7 дней кукурузным маслом по 150 мкл, содержащиеся на WTD (положительный контроль модели атеросклероза для мышей, обработанных тамоксифеном Rosa26/Cre-ERT2/*Cdk8fl/fl*), $n = 5$.

4. Rosa WTD — мыши линии Rosa26/Cre-ERT2, содержащиеся на WTD (отрицательный контроль модели

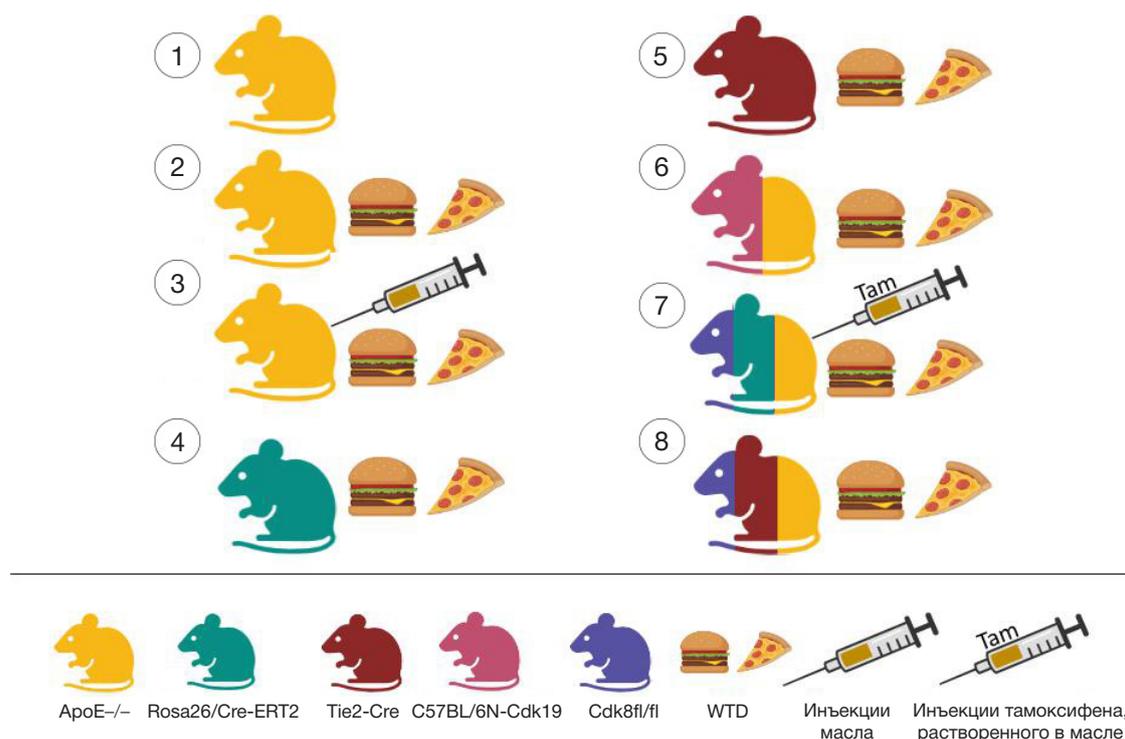


Рис. 1. Схематичное изображение групп мышей, участвующих в эксперименте. Создано с помощью BioRender.com

атеросклероза для мышей *Rosa26/Cre-ERT2/Cdk8fl/fl*, $n = 4$.

5. *Tie2* WTD — мыши линии *Tie2-Cre*, содержащиеся на WTD (отрицательный контроль модели атеросклероза для мышей и *Tie2-Cre/Cdk8fl/fl/ApoE-/-*), $n = 4$.

6. *Cdk19/ApoE* WTD — мыши с нокаутом гена *Cdk19* на фоне нокаута гена *ApoE*, содержащиеся на WTD, $n = 8$.

7. *Cdk8/Rosa/ApoE* WTD — мыши *Rosa26/Cre-ERT2/Cdk8fl/fl* с индуцибельным нокаутом гена *Cdk8* на фоне нокаута гена *ApoE*, содержащиеся на WTD, $n = 6$.

8. *Cdk8/Tie/ApoE* WTD — мыши с конститутивным эндотелиоспецифичным нокаутом гена *Cdk8* на фоне нокаута *ApoE*, содержащиеся на WTD, $n = 7$.

Критерии исключения

В эксперименте участвовали только самцы. Исключение животных из эксперимента проводили на основании ухудшения клинического статуса, проявляющегося вялостью, апатией, отказом от пищи, а также при спонтанной гибели животного до плановой эвтаназии. По последнему критерию из исследования было исключено пять животных: два из группы (1), по одному из групп (4), (5) и (7).

Атерогенная диета

Взрослых мышей различных экспериментальных групп возрастом 3 месяца держали на атерогенной диете. Диета содержала 21,2% молочного жира («Пармалат», Россия), 34% сахарозы (Solarbio, Китай) и 0,2% холестерина (Macklin, Китай) [21]. Для индукции развития атерогенных поражений мыши содержали на атерогенной диете в течение 2 месяцев.

Исследование аорт

Сепарацию, окрашивание аорт мышей и обработку изображений проводили, как описано ранее [22]. Мышей

наркотизировали раствором 0,6 мл Золетила (Virbac, Франция) + 0,3 мл Ксилазина (Interchemie Werken "de Adelaar" BV, Нидерланды) + 9 мл физиологического раствора («Панэко», Россия) в дозе 100 мкл на 10 г массы животного, внутривенно, затем через пункцию верхушки левого желудочка перфузировали сердечно-сосудистую систему 10 мл PBS (BioinnLabs, Россия) для вымывания крови. Под стереомикроскопом Zeiss Stemi DV4 (Carl Zeiss, Германия) аккуратно выделяли всю аорту от дуги до подвздошных артерий, удаляли периваскулярную жировую и соединительную ткань вокруг аорты, избегая ее повреждения. Для фиксации тканей проводили перфузию 10 мл 4%-го раствора параформальдегида («Медикс», Россия). Далее аорту помещали в 1 мл свежеприготовленного 60%-го раствора Oil Red O (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. После окрашивания препарат промывали 60%-м изопропанолом (Panreac AppliChem, Германия) в течение 20 мин, а затем трижды дистиллированной водой по 5 мин. Под микроскопом окончательно очищали аорту от остатков окрашенной периваскулярной жировой ткани, переносили на предметное стекло и получали цифровые микрофотографии в высоком разрешении. Полученные изображения обрабатывали с использованием программного обеспечения ImageJ. Процент атеросклеротических поражений рассчитывали как отношение площади поражений к общей площади восходящей части и дуги аорты.

Вестерн-блот

Был проведен анализ уровней CDK8 и CDK19 в аортах мышей всех исследуемых групп. Для детекции CDK8 и CDK19 использовали антитела CDK8 (D6M3J) Rabbit 17395 (Cell Signaling, США) и антитела для CDK19 из работы [18] соответственно, в разведении 1 : 1000. Уровень белка β -актина определяли в качестве контроля нагрузки. Для этого использовали моноклональные мышинные антитела

Таблица. Олигонуклеотиды, использованные в работе

	Последовательность 5'→3'
P1	GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG
P2	TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C
P3	GCC GCC CCG ACT GCA TCT
P4	CTG TGA CCT GAG TGC CCA GT
P5	GCG TTT AAG TAA TGG GAT GGT C
P6	CCA CAC ACG TGC ACA TAT AGA

β -actin (A2228, Sigma-Aldrich, США) в рабочем разведении 1 : 1000. Детекцию проводили с использованием вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP): Anti-rabbit IgG (кат. № 7074, Cell Signaling, США) и Anti-mouse IgG (кат. № 7076, Cell Signaling, США) в разведении 1 : 2000. Визуализацию результатов вестерн-блоттинга выполняли на системе iBright FL1500 (Invitrogen, США).

Статистическая обработка данных

Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе объектом исследования были генетически модифицированные мыши с системным и эндотелиоспецифичным нокаутом гена *Cdk8*, а также с системным нокаутом гена *Cdk19*. На первом этапе работы проводили валидацию уровня белков CDK8 и CDK19 в аорте мышей разных экспериментальных групп (рис. 2).

Оказалось, что у контрольных мышей линии ApoE, Tie и Rosa в аорте детектируются белки CDK8 и CDK19, в то время как у мышей с системным нокаутом *Cdk8* (группа *Cdk8/Rosa/ApoE*) отсутствует CDK8, а у мышей с системным нокаутом *Cdk19* (группа *Cdk19/ApoE*) отсутствует CDK19. При этом у мышей с эндотелиоспецифичным нокаутом *Cdk8* (группа *Cdk8/Tie/ApoE*) белок CDK8 детектируется. Наблюдаемое присутствие белка согласуется с гистологическим строением аорты, которая состоит из трех слоев: адвентиции, медиа и интимы, основную часть которой и составляет эндотелий [23]. Таким образом, в данной группе нокаут *Cdk8* затрагивает преимущественно эндотелиальные клетки интимы, что и объясняет обнаружение белка CDK8 в гомогенате всей аорты.

Далее проводили исследование аорт у мышей всех экспериментальных групп после содержания на атерогенной диете в течение 2 месяцев. Значения, полученные от мышей из экспериментальных групп *Cdk19/ApoE* WTD и *Cdk8/Tie/ApoE* WTD, сравнивали со значениями группы ApoE WTD, являющейся положительным контролем в эксперименте; со значениями групп Tie WTD, а также ApoE на стандартном рационе, служившими отрицательным контролем (рис. 3).

Оказалось, что в группе мышей с эндотелиоспецифичным нокаутом *Cdk8* происходит достоверное ($p = 0,0295$) снижение площади поражения аорты по сравнению с положительным контролем ApoE. При этом в группе с системным нокаутом *Cdk19* площадь поражения не отличается от контрольных групп.

В процессе индукции нокаута гена *Cdk8* в группе *Cdk8/Rosa/ApoE* мышей подвергали ежедневным инъекциям

тамоксифена, растворенного в кукурузном масле. Для создания положительного контроля для данной группы использовали мышей ApoE, обработанных кукурузным маслом по аналогичной схеме. После содержания на атерогенной диете было проведено исследование атеросклеротических поражений аорты у мышей *Cdk8/Rosa/ApoE* WTD, ApoE + Oil WTD в качестве положительного контроля; Rosa WTD, а также ApoE на стандартном рационе в качестве отрицательных контролей (рис. 4).

Оказалось, что значения, полученные от мышей с системным нокаутом *Cdk8*, достоверно ($p = 0,0024$) ниже значений положительного контроля и не отличаются от значений отрицательного контроля.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Генетически модифицированные животные — широко распространенный инструмент для моделирования и последующего исследования патогенеза заболеваний человека, а также разработки методов терапии [24]. Это обуславливает их важную роль при исследованиях таких социально значимых патологий, как атеросклероз. Атеросклероз как хронический прогрессирующий патологический процесс лежит в основе большинства случаев сердечно-сосудистой патологии, что определяет высокие показатели летальности и инвалидизации населения [25].

Известно, что транскрипционная киназа CDK8 и ее паралог CDK19 модулируют сигнальные пути транскрипционных факторов STAT1 и NF- κ B, тем самым регулируя воспалительный ответ. В ряде работ было показано, что низкомолекулярные ингибиторы CDK8/19, такие как SenexinA/B, Cmpd3/4, Cpd32, Cortistatin A эффективно подавляют активацию ключевых провоспалительных транскрипционных факторов STAT1 и NF- κ B *in vitro* и *in vivo* [7, 8, 26, 27]. Кроме того, показана роль CDK8 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний,

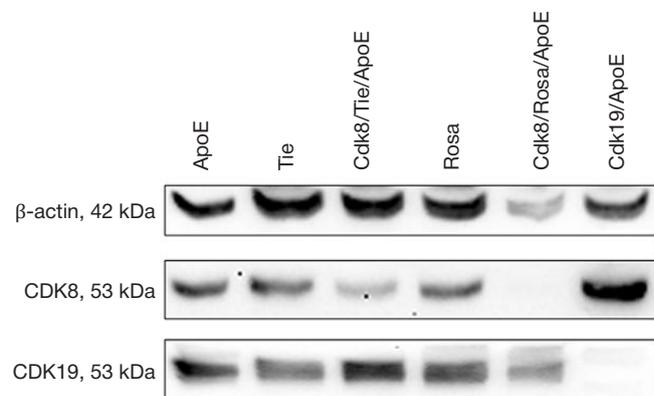


Рис. 2. Репрезентативное изображение вестерн-блота, иллюстрирующее содержание CDK8 и CDK19 в аорте мышей разных экспериментальных групп

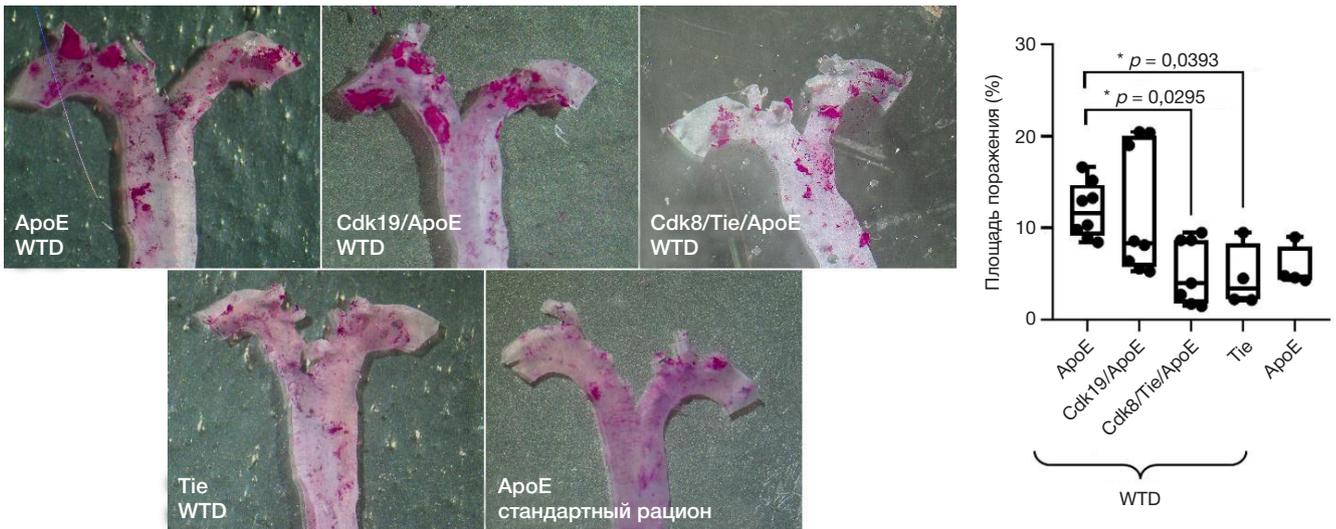


Рис. 3. Исследование аорт у мышей из экспериментальных групп ApoE WTD, Cdk19/ApoE WTD, Cdk8/Tie/ApoE WTD, Tie WTD, а также ApoE на стандартном корме. Репрезентативное изображение исследуемых аорт (слева), а также диаграмма обсчета площадей поражения (справа). Области поражения аорты отмечены белыми пунктирными линиями (* — $p < 0,05$)

так как данная киназа является корегулятором HIF-1 α , участвующего в проатерогенных процессах [9, 10, 28].

В данной работе было проведено исследование роли транскрипционных киназ CDK8 и CDK19 при формировании атеросклеротических поражений с использованием генетически модифицированных мышей с системным и эндотелиоспецифичным нокаутом *Cdk8*, а также с системным нокаутом *Cdk19*. Для моделирования накопления липопротеинов в стенке аорты данные мыши были переведены на фон нокаута *ApoE*. Ген *ApoE* кодирует белок аполипопротеин E, который играет центральную роль в метаболизме липопротеинов. Одна из его основных функций — служить лигандом для рецепторов печени, которые удаляют из кровотока остатки хиломикрон и ЛПНП. У мышей *ApoE*^{-/-} отсутствует ключевой механизм очистки плазмы от богатых холестерином липопротеинов, что приводит к резкому повышению уровня холестерина

в плазме, накоплению в крови ЛПНП и последующему развитию атеросклеротических поражений [17].

Нокаут *CDK8* и *CDK19* был подтвержден в аортах исследуемых мышей методом вестерн-блот (рис. 2). Показаны отсутствие *CDK19* в группе мышей *CDK19/ApoE* с системным нокаутом гена *Cdk19*, отсутствие *CDK8* в группе мышей *CDK8/Rosa/ApoE* с системным нокаутом гена *Cdk8*, а также неполное удаление *CDK8* в группе *CDK8/Tie/ApoE* с эндотелиоспецифичным нокаутом *Cdk8*. Таким образом, мы показали, что данные модели релевантны.

Исследование накопления липидных включений в аортах подопытных мышей показало, что как эндотелиоспецифичный (рис. 3), так и системный (рис. 4) нокаут *Cdk8* приводит к достоверному снижению площади поражения сосуда. При этом тотальный нокаут *Cdk8* оказывает более выраженный антиатерогенный эффект по сравнению с эндотелиоспецифичным. Полученные данные

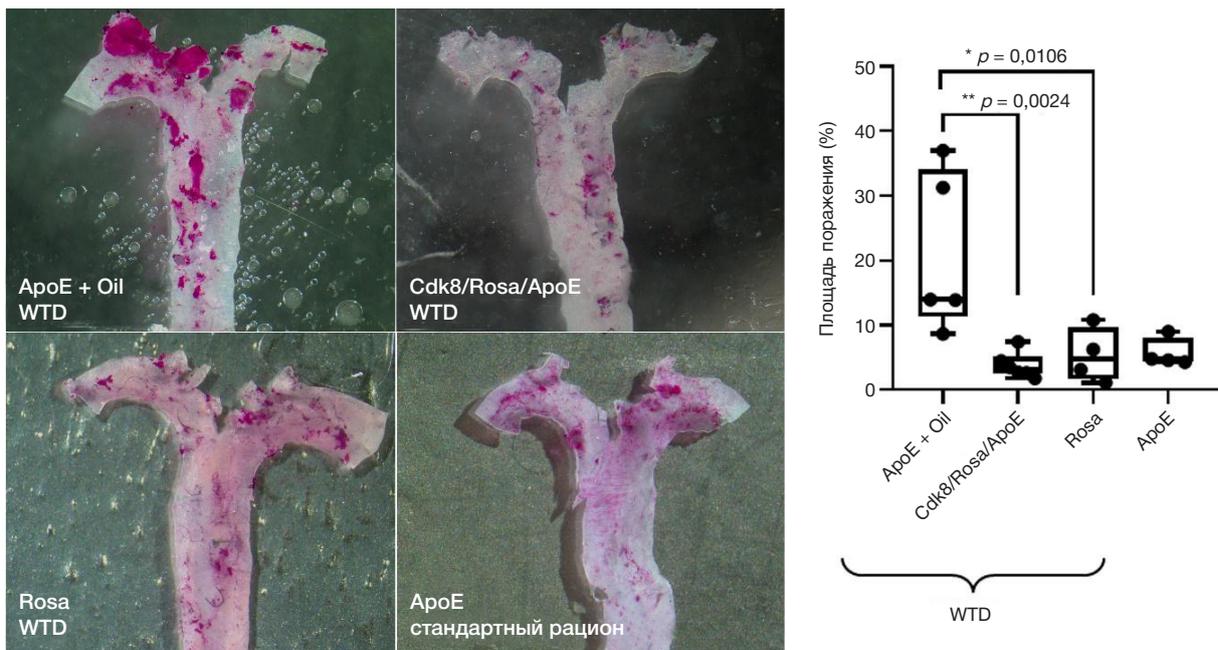


Рис. 4. Исследование аорт у мышей из экспериментальных групп ApoE + Oil WTD, Cdk8/Rosa/ApoE WTD, Rosa WTD, а также ApoE на стандартном корме. Репрезентативное изображение исследуемых аорт (слева), а также диаграмма обсчета площадей поражения (справа). Область поражения аорты отмечена белой пунктирной линией (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$)

позволяют предположить, что вклад CDK8 в патогенез атеросклероза не ограничивается эндотелиальными клетками, а также опосредован его функцией в других ключевых для данного заболевания типах клеток, таких как макрофаги и, возможно, гладкомышечные клетки сосудов. Эти результаты согласуются с данными литературы, которые демонстрируют снижение противоспалительного ответа при ингибировании CDK8/19 в моноцитах/макрофагах [29]. Согласно полученным результатам, CDK8 принимает участие в усилении атеросклеротического фенотипа, вероятно, через регуляцию транскрипционных программ, связанных с воспалительным ответом и метаболизмом липидов.

В отличие от CDK8, системная инактивация гена *Cdk19* не оказала статистически значимого влияния на площадь атеросклеротических поражений аорты, что демонстрирует сопоставимые показатели с группами как отрицательного, так и положительного контроля (рис. 3). Стоит отметить, что в группе *Cdk19/ApoE* наблюдалась значительная межиндивидуальная вариабельность, включающая образцы как с обширной, так и с минимальной площадью поражений. Данное распределение, наряду с отсутствием общего эффекта, позволяет предположить, что CDK19, в отличие от своего паралога CDK8, не играет детерминирующей роли в прогрессии атеросклероза.

Хроническое воспаление является краеугольным камнем в патогенезе атеросклероза [2], а наши результаты прямо указывают на проатерогенную роль CDK8. Учитывая, что CDK8 является регулятором воспалительного ответа [6–8], можно предположить, что фармакологическое ингибирование данной киназы будет воспроизводить наблюдаемый нами антиатерогенный эффект за счет подавления провоспалительных сигнальных путей. Таким образом, применение известных ингибиторов CDK8 в экспериментальных моделях атеросклероза представляется перспективным направлением для разработки новых терапевтических подходов.

Выводы

Проведенное исследование раскрывает фундаментальные аспекты регуляции атерогенеза, связанные с функцией транскрипционных киназ CDK8 и CDK19. Использование генетических моделей на мышах линии ApoE^{-/-} с нокаутом указанных генов позволило установить, что CDK8 функционирует как проатерогенный регулятор — это подтверждается статистически значимым уменьшением площади атеросклеротических поражений при его нокауте. Более выраженный антиатерогенный эффект системного нокаута по сравнению с эндотелиоспецифичным свидетельствует о плейотропном характере влияния CDK8 на патогенез заболевания, включая его роль не только в эндотелиальных клетках, но и в других клеточных популяциях, в частности в макрофагах. Молекулярные механизмы проатерогенного действия CDK8, по-видимому, связаны с его способностью регулировать ключевые транскрипционные программы, включая пути HIF-1 α , STAT1 и NF- κ B, что модулирует воспалительный ответ и метаболизм липидов в стенке сосуда. CDK19 не проявляет значимого влияния на развитие атеросклеротических поражений, что подчеркивает функциональную дивергенцию между структурно гомологичными киназами CDK8 и CDK19 в контексте патогенеза атеросклероза. Полученные результаты не только расширяют понимание молекулярных основ атеросклероза, но и открывают новые возможности для разработки таргетной терапии. Ингибирование CDK8 представляет собой перспективную стратегию для подавления прогрессирования атеросклеротических поражений. Дальнейшие исследования должны быть направлены на уточнение клеточно-специфичных механизмов действия CDK8 в различных популяциях клеток сосудистой стенки и оценку эффективности селективных ингибиторов CDK8 в доклинических испытаниях.

Литература

1. Косолапов В. П., Ярмонова М. В.. Анализ высокой сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности взрослого населения как медико-социальной проблемы и поиск путей ее решения. Уральский медицинский журнал. 2021; 20 (1): 58–64.
2. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *Journal of cardiology*. 2019; 73 (1): 22–7.
3. Zhong J, Shi G. Regulation of inflammation in chronic disease. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 737.
4. Hetherington I, Totary-Jain H. Anti-atherosclerotic therapies: milestones, challenges, and emerging innovations. *Molecular Therapy*. 2022; 30 (10): 3106–17.
5. Madaudo C, Coppola G, Parlati AL, Corrado E. Discovering inflammation in atherosclerosis: insights from pathogenic pathways to clinical practice. *International journal of molecular sciences*. 2024; 25 (11): 6016.
6. Yamamoto S, Hagihara T, Horiuchi Y, Okui A, Wani S, Yoshida T, et al. Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9. *Genes to Cells*. 2017; 22 (3): 265–76.
7. Kokinos EK, Tsymbal SA, Galochkina AV, Bezlepina SA, Nikolaeva JV, Vershinina SO, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases 8/19 restricts bacterial and virus-induced inflammatory responses in monocytes. *Viruses*. 2023; 15 (6): 1292.
8. Dannappel MV, Sooraj D, Loh JJ, Firestein R. Molecular and in vivo functions of the CDK8 and CDK19 kinase modules. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019; 6: 171.
9. Galbraith MD, Allen MA, Bensard CL, Wang X, Schwinn MK, Qin B et al. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell*. 2013; 153 (6): 1327–39.
10. Knutson AK, Williams AL, Boisvert WA, Shohet RV. HIF in the heart: development, metabolism, ischemia, and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021; 131 (17).
11. Liang X, Arullampalam P, Yang Z, Ming XF. Hypoxia enhances endothelial intercellular adhesion molecule 1 protein level through upregulation of arginase type II and mitochondrial oxidative stress. *Frontiers in physiology*. 2019; 10: 1003.
12. Ortiz-Masia D, Díez I, Calatayud S, Hernandez C, Cosín-Roger J, Hinojosa J et al. Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e48535.
13. Thomas C, Leleu D, Masson D. Cholesterol and HIF-1 α : dangerous liaisons in atherosclerosis. *Frontiers in immunology*. 2022; 13: 868958.
14. Yin X, He Z, Chen K, Ouyang K, Yang C, Li J, et al. Unveiling the impact of CDK8 on tumor progression: mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in Pharmacology*. 2024; 15: 1386929.
15. Roninson I, Györfy B, Mack ZT, Shtil AA, Shtutman MS, Chen M, et al. Identifying Cancers for CDK8/19 Inhibitor Therapy. *Cells*. 2019; 8 (8).
16. Arnett A, Moo KG, Flynn KJ, Sundberg TB, Johannessen L, Shamji AF, et al. The cyclin-dependent kinase 8 (CDK8) inhibitor DCA promotes a tolerogenic chemical immunophenotype in CD4+ T cells via

- a novel CDK8-GATA3-FOXP3 pathway. *Molecular and cellular biology*. 2021; 41 (9): e00085–21.
17. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J. The Apoe^{-/-} mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *Journal of translational medicine*. 2016; 14 (1): 146.
 18. Bruter AV, Varlamova EA, Stavskaya NI, Antysheva ZG, Mansikh VN, Tvorogova AV, et al. Knockout of cyclin-dependent kinases 8 and 19 leads to depletion of cyclin C and suppresses spermatogenesis and male fertility in mice. *Elife*. 2025; 13: RP96465.
 19. Deuchar GA, McLean D, Hadoke PW, Brownstein DG, Webb DJ, Mullins JJ, et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency accelerates atherogenesis and causes proinflammatory changes in the endothelium in apoe^{-/-} mice. *Endocrinology*. 2011; 152 (1): 236–46.
 20. Ilchuk LA, Stavskaya NI, Varlamova EA, Khamidullina AI, Tatarskiy VV, Mogila VA, et al. Limitations of tamoxifen application for in vivo genome editing using Cre/ERT2 system. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23 (22): 14077.
 21. Hasegawa Y, Chen SY, Sheng L, Jena PK, Kalanetra KM, Mills DA, et al. Long-term effects of western diet consumption in male and female mice. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 14686.
 22. Chen PY, Qin L, Simons M. Imaging and analysis of oil red o-stained whole aorta lesions in an aneurysm hyperlipidemia mouse model. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2022; (183): 10–3791.
 23. Milutinović A, Šuput D, Zorc-Plesković R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2020; 20 (1): 21.
 24. Bontzos G, Detorakis ET. Animal models of uveal melanoma for localized interventions. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*. 2017; 22 (3–4).
 25. Chen W, Li Z, Zhao Y, Chen Y, Huang R. Global and national burden of atherosclerosis from 1990 to 2019: trend analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *Chinese Medical Journal*. 2023; 136 (20): 2442–50.
 26. Guo Z, Wang G, Lv Y, Wan YY, Zheng J. Inhibition of Cdk8/Cdk19 Activity Promotes Treg Cell Differentiation and Suppresses Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018; 10: 1988.
 27. Chen M, Li J, Liang J, et al. Systemic Toxicity Reported for CDK8/19 Inhibitors CCT251921 and MSC2530818 Is Not Due to Target Inhibition. *Cells*. 2019; 8 (11): 1413.
 28. Hall DD, Ponce JM, Chen B, Spitler KM, Alexia A, Oudit GY, et al. Ectopic expression of Cdk8 induces eccentric hypertrophy and heart failure. *JCI insight*. 2017; 2 (15): e92476.
 29. Neznamov AN, Baykova YP, Kubekina MV. The Role of CDKs in the Regulation of the Monocyte/Macrophage Immune Response. *Curr Med Chem*. Published online May 29, 2025.

References

1. Kosolapov VP, YArmonova MV. Analiz vysokoj serdechno-sosudistoj zabolvaemosti i smertnosti vzroslogo naseleniya kak mediko-social'noj problemy i poisk putej ee resheniya. *Ural'skij medicinskij zhurnal*. 2021; 20 (1): 58–64. Russian.
2. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *Journal of cardiology*. 2019; 73 (1): 22–7.
3. Zhong J, Shi G. Regulation of inflammation in chronic disease. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: 737.
4. Hetherington I, Totary-Jain H. Anti-atherosclerotic therapies: milestones, challenges, and emerging innovations. *Molecular Therapy*. 2022; 30 (10): 3106–17.
5. Madaudo C, Coppola G, Parlati AL, Corrado E. Discovering inflammation in atherosclerosis: insights from pathogenic pathways to clinical practice. *International journal of molecular sciences*. 2024; 25 (11): 6016.
6. Yamamoto S, Hagihara T, Horiuchi Y, Okui A, Wani S, Yoshida T, et al. Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF- κ B and C/EBP β on stimulation of Toll-like receptor 9. *Genes to Cells*. 2017; 22 (3): 265–76.
7. Kokinos EK, Tsymbal SA, Galochkina AV, Bezlepina SA, Nikolaeva JV, Vershinina SO, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases 8/19 restricts bacterial and virus-induced inflammatory responses in monocytes. *Viruses*. 2023; 15 (6): 1292.
8. Dannappel MV, Sooraj D, Loh JJ, Firestein R. Molecular and in vivo functions of the CDK8 and CDK19 kinase modules. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019; 6: 171.
9. Galbraith MD, Allen MA, Bensard CL, Wang X, Schwinn MK, Qin B et al. HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. *Cell*. 2013; 153 (6): 1327–39.
10. Knutson AK, Williams AL, Boisvert WA, Shohet RV. HIF in the heart: development, metabolism, ischemia, and atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 2021; 131 (17).
11. Liang X, Arullampalam P, Yang Z, Ming XF. Hypoxia enhances endothelial intercellular adhesion molecule 1 protein level through upregulation of arginase type II and mitochondrial oxidative stress. *Frontiers in physiology*. 2019; 10: 1003.
12. Ortiz-Masia D, Díez I, Calatayud S, Hernandez C, Cosín-Roger J, Hinojosa J et al. Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e48535.
13. Thomas C, Leleu D, Masson D. Cholesterol and HIF-1 α : dangerous liaisons in atherosclerosis. *Frontiers in immunology*. 2022; 13: 868958.
14. Yin X, He Z, Chen K, Ouyang K, Yang C, Li J, et al. Unveiling the impact of CDK8 on tumor progression: mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in Pharmacology*. 2024; 15: 1386929.
15. Roninson I, Gyórfy B, Mack ZT, Shtil AA, Shtutman MS, Chen M, et al. Identifying Cancers for CDK8/19 Inhibitor Therapy. *Cells*. 2019; 8 (8).
16. Amett A, Moo KG, Flynn KJ, Sundberg TB, Johannessen L, Shamji AF, et al. The cyclin-dependent kinase 8 (CDK8) inhibitor DCA promotes a tolerogenic chemical immunophenotype in CD4⁺ T cells via a novel CDK8-GATA3-FOXP3 pathway. *Molecular and cellular biology*. 2021; 41 (9): e00085–21.
17. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J. The Apoe^{-/-} mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *Journal of translational medicine*. 2016; 14 (1): 146.
18. Bruter AV, Varlamova EA, Stavskaya NI, Antysheva ZG, Mansikh VN, Tvorogova AV, et al. Knockout of cyclin-dependent kinases 8 and 19 leads to depletion of cyclin C and suppresses spermatogenesis and male fertility in mice. *Elife*. 2025; 13: RP96465.
19. Deuchar GA, McLean D, Hadoke PW, Brownstein DG, Webb DJ, Mullins JJ, et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency accelerates atherogenesis and causes proinflammatory changes in the endothelium in apoe^{-/-} mice. *Endocrinology*. 2011; 152 (1): 236–46.
20. Ilchuk LA, Stavskaya NI, Varlamova EA, Khamidullina AI, Tatarskiy VV, Mogila VA, et al. Limitations of tamoxifen application for in vivo genome editing using Cre/ERT2 system. *International journal of molecular sciences*. 2022; 23 (22): 14077.
21. Hasegawa Y, Chen SY, Sheng L, Jena PK, Kalanetra KM, Mills DA, et al. Long-term effects of western diet consumption in male and female mice. *Scientific reports*. 2020; 10 (1): 14686.
22. Chen PY, Qin L, Simons M. Imaging and analysis of oil red o-stained whole aorta lesions in an aneurysm hyperlipidemia mouse model. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2022; (183): 10–3791.
23. Milutinović A, Šuput D, Zorc-Plesković R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2020; 20 (1): 21.
24. Bontzos G, Detorakis ET. Animal models of uveal melanoma for

- localized interventions. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*. 2017; 22 (3–4).
25. Chen W, Li Z, Zhao Y, Chen Y, Huang R. Global and national burden of atherosclerosis from 1990 to 2019: trend analysis based on the Global Burden of Disease Study 2019. *Chinese Medical Journal*. 2023; 136 (20): 2442–50.
26. Guo Z, Wang G, Lv Y, Wan YY, Zheng J. Inhibition of Cdk8/Cdk19 Activity Promotes Treg Cell Differentiation and Suppresses Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018; 10: 1988.
27. Chen M, Li J, Liang J, et al. Systemic Toxicity Reported for CDK8/19 Inhibitors CCT251921 and MSC2530818 Is Not Due to Target Inhibition. *Cells*. 2019; 8 (11): 1413.
28. Hall DD, Ponce JM, Chen B, Spittler KM, Alexia A, Oudit GY, et al. Ectopic expression of Cdk8 induces eccentric hypertrophy and heart failure. *JCI insight*. 2017; 2 (15): e92476.
29. Neznamov AN, Baykova YP, Kubekina MV. The Role of CDKs in the Regulation of the Monocyte/Macrophage Immune Response. *Curr Med Chem*. Published online May 29, 2025.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ВАРИАНТ *rs293795 OGG1* КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ФАКТОР РИСКА ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ

Е. В. Семикина, Ю. Э. Азарова [✉], С. А. Паничев, О. И. Басарева, Н. В. Джанчатова, Е. Ю. Алферова, А. В. Полоников

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Диабетическая нефропатия (ДНФ) — грозное осложнение сахарного диабета 2-го типа (СД2), приводящее к ранней инвалидности и смертности от терминальной почечной недостаточности. В экспериментальных и клинических исследованиях показана ведущая роль индуцированных окислительным стрессом повреждений макромолекул, в том числе ДНК, в развитии и прогрессировании ДНФ на фоне гипергликемии. Восстановление этих повреждений служит сигналом для прекращения продолжающегося окислительного стресса. Ключевым ферментом репарации ДНК является 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза, кодируемая геном *OGG1*. Целью работы было провести анализ ассоциаций пяти полиморфных вариантов *rs2072668*, *rs1052133*, *rs293795*, *rs2304277*, *rs6443265* гена *OGG1* с риском развития ДНФ у пациентов с СД2. В исследование включен 1461 пациент с СД2, у 577 из которых диагностирована ДНФ. Генотипирование ДНК выполнено методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени с использованием аллель-специфичных флуоресцентно меченых зондов. Установлены ассоциации генотипа *rs293795-G/G* (OR = 1,97, 95% CI = 1,23-3,16; $p = 0,007$) и гаплотипа *rs2072668C-rs1052133C-rs293795G-rs2304277G-rs6443265C* (OR = 1,30, 95% CI = 1,06-1,60; $p = 0,012$) гена *OGG1* с предрасположенностью к ДНФ на фоне СД2. Кроме того, установлено шесть диглоблотов *OGG1*, ассоциированных с повышенным риском ДНФ, и один диглоблот, ассоциированный с пониженным риском ДНФ у пациентов с СД2. Таким образом, в проведенном исследовании представлены данные об ассоциации полиморфизма гена *OGG1* с ДНФ, что создает научный потенциал для дальнейших работ по изучению вклада нарушений системы репарации окислительных повреждений ДНК в развитие микрососудистых осложнений СД2.

Ключевые слова: ДНК-гликозилазы, репарация ДНК, *OGG1*, генетическая предрасположенность, методы генотипирования, ПЦР в реальном времени, сахарный диабет 2-го типа, диабетическая нефропатия

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-25-20072) и Министерства образования и науки Курской области (соглашение №241 от 19.05.2025).

Вклад авторов: Е. В. Семикина — генотипирование образцов ДНК, анализ полученных данных, написание текста; Ю. Э. Азарова — концепция и дизайн исследования, привлечение финансирования, сбор и обработка материалов, написание текста; С. А. Паничев — генотипирование образцов ДНК, внесение результатов генотипирования в базу данных; О. И. Басарева — отбор функционально значимых полиморфных вариантов гена *OGG1*, подбор праймеров и зондов для генотипирования SNP; Н. В. Джанчатова — генотипирование образцов ДНК; Е. Ю. Алферова — пробоподготовка: экстракция ДНК из крови, измерение концентрации и чистоты образцов ДНК; А. В. Полоников — анализ полученных данных, обзор литературы, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Курского государственного медицинского университета (протокол № 1 от 20 января 2025 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Юлия Эдуардовна Азарова
ул. Ямская, д. 18, г. Курск, 305041, Россия; azzzzar@yandex.ru

Статья получена: 21.11.2025 **Статья принята к печати:** 19.12.2025 **Опубликована онлайн:** 24.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.084

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/>).

SINGLE NUCLEOTIDE VARIANT *rs293795 OGG1* AS A GENETIC RISK FACTOR FOR DIABETIC NEPHROPATHY

Semikina EV, Azarova IE [✉], Panichev SA, Basareva OI, Dzhanchatova NV, Alferova EYu, AV Polonikov

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Diabetic nephropathy (DNP) is a serious complication of type 2 diabetes mellitus (T2DM), leading to early disability and mortality from end-stage renal failure. Experimental and clinical studies have shown the leading role of oxidative stress-induced damage to macromolecules, including DNA, in the development and progression of DNP against the background of hyperglycemia. On the contrary, repair of this damage serves as a signal to stop ongoing oxidative stress. The key enzyme in DNA repair is 8-oxoguanine DNA glycosylase, encoded by the *OGG1* gene. The aim of this study was to analyze the associations of five polymorphic variants *rs2072668*, *rs1052133*, *rs293795*, *rs2304277*, *rs6443265* of the *OGG1* gene with the risk of developing DNP in patients with T2DM. The study included 1461 patients with type 2 diabetes, 577 of whom were diagnosed with DNP. DNA genotyping was performed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) with allele-specific fluorescent probes. Associations were established between the *rs293795-G/G* genotype (OR = 1.97, 95% CI = 1.23–3.16, $p = 0.007$) and the *rs2072668C-rs1052133C-rs293795G-rs2304277G-rs6443265C* haplotype (OR = 1.30, 95% CI = 1.06–1.60, $p = 0.012$) of the *OGG1* gene with a predisposition to DNP in patients with T2DM. In addition, 6 *OGG1* diplotypes associated with an increased risk of DNP and one diplotype associated with a reduced risk of DNP in patients with T2DM were identified. Thus, the study presents for the first time data on the association of the *OGG1* gene polymorphism with DNP, which creates a scientific foundation for further research on the contribution of disturbances in the DNA oxidative damage repair system to the development of microvascular complications of T2DM.

Keywords: DNA glycosylases, DNA repair, *OGG1*, genetic predisposition, genotyping methods, real-time PCR, type 2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy

Funding: the study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 25-25-20072) and the Ministry of Education and Science of the Kursk Region (agreement No. 241 dated May 19, 2025).

Author contribution: Semikina EV — genotyping of DNA samples, analysis of obtained data, writing of the text; Azarova YuE — concept and design of the study, fundraising, collection and processing of materials, writing of the text; Panichev SA — genotyping of DNA samples, entering genotyping results into the database; Basareva OI — selection of functionally significant polymorphic variants of the *OGG1* gene, selection of primers and probes for SNP genotyping; Dzhanchatova NV — genotyping of DNA samples; Alferova EYu — sample preparation: DNA extraction from blood, measurement of concentration and purity of DNA samples; Polonikov AV — analyzed the data, reviewed the literature, and made final edits. The authors approved the version for publication and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that any questions related to the accuracy and integrity of any part of it are properly reviewed and resolved.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Regional Ethics Committee at Kursk State Medical University (meeting minutes No. 1 dated January 20, 2025).

✉ **Correspondence should be addressed:** Lullia E. Azarova
Yamskaya, 18, Kursk, 305041, Russia; Email: azzzzar@yandex.ru

Received: 21.11.2025 **Accepted:** 19.12.2025 **Published online:** 24.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.084

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 2-го типа (СД2) является самой распространенной эндокринной патологией обмена веществ в мире [1]. За последние 20 лет число больных СД в мире увеличилось почти в 4 раза со 151 млн в 2000 г. до 589 млн человек в 2025 г. Более 8,2 млн больных СД2 проживают в Российской Федерации [2].

Известно, что СД2 — один из ведущих факторов риска развития мозгового инсульта и инфаркта миокарда, а также основная причина потери зрения, нетравматических ампутаций и развития терминальных стадий почечной недостаточности [3]. Диабетическая нефропатия (ДНФ) — это клинический синдром, характеризующийся постоянной альбуминурией и прогрессирующим снижением функции почек [4]. Механизмы развития ДНФ очень сложны, и, несмотря на десятилетия интенсивных исследований, патогенез этого осложнения до сих пор полностью не изучен [5–7]. Известно, что многочисленные пути и процессы, такие как окислительный стресс, активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, митоген-активируемых протеинкиназ, образование конечных продуктов гликозилирования, избыточная продукция факторов роста соединительной ткани и провоспалительных цитокинов способствуют возникновению и прогрессированию поражения почек при СД2 [8].

Недавно проведенные генетические и биохимические исследования у людей и на животных подтвердили необходимость слаженной работы ферментов репарации для выживания клеток в условиях окислительного стресса [9–12]. Избыточная продукция активных форм кислорода на фоне перегрузки нутриентами у пациентов с избыточной массой тела и ожирением способна нанести значительный ущерб любым клеточным макромолекулам, особенно ДНК: подсчитано, что в среднем за 24 ч на одну клетку человеческого организма приходится 10 000 повреждений ДНК, причем окислительное повреждение ДНК превалирует [13]. Структуры всех четырех азотистых оснований ДНК восприимчивы к окислительному повреждению при воздействии активных форм кислорода, при этом идентифицировано более ста различных типов окислительных повреждений оснований, включая продукты с разрывом гетероциклов и образованием окисленных ароматических производных [14–15]. Изменение структуры азотистых оснований в результате окислительного повреждения меняет их способность образовывать водородные связи с основанием-партнером при синтезе комплементарной цепи, что служит основным источником мутаций и причиной нарушения экспрессии генов [16].

В большинстве случаев механизмы репарации ДНК, включая эксцизионную репарацию оснований, эксцизионную репарацию нуклеотидов, прямую реверсивную репарацию, репарацию ошибочных спариваний, гомологичную рекомбинацию, исправляют возникшее повреждение и поддерживают гомеостаз клетки [17]. Эксцизионная репарация оснований наиболее эффективна именно при восстановлении эндогенных окислительных повреждений пуринов или пиримидинов ДНК и протекает с использованием ДНК-гликозилаз, таких как *mutY* ДНК-гликозилаза *MUTYH*, *nth*-подобная ДНК-гликозилаза *1 NTHL1*, 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза *OGG1* или *nei*-подобная ДНК-гликозилаза *1 NEIL1*, распознающих aberrантное азотистое основание и вырезающих его [18].

Из четырех азотистых оснований ДНК гуанин чаще других подвергается окислению [19]. Фермент 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза *OGG1* обладает способностью удалять 8-оксогуанин и 2,6-диамино-4-гидрокси-5-N-

метилформаимидопиримидин, являясь частью сложной системы репарации окислительных повреждений гуанина в составе ДНК [20–21]. В экспериментальной работе показано снижение эффективности процессов репарации при СД2, что приводит к старению клеток, активации воспаления, и в конечном счете, к фиброзу почек и легких [22]. Генетически детерминированный дефект элиминации aberrантного гуанина у носителей *rs1052133* гена 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы ассоциируется с СД2 у американцев мексиканского происхождения [23] и японцев [24], однако в целом исследования роли генов репарации окислительных повреждений ДНК в развитии СД2 и его осложнений немногочисленны, противоречивы, не имеют системного охвата, выполнены на малых выборках и плохо воспроизводимы в репликативных исследованиях.

Цель настоящего исследования — провести анализ ассоциаций пяти полиморфных вариантов *rs2072668*, *rs1052133*, *rs293795*, *rs2304277*, *rs6443265* гена *OGG1* с риском развития ДНФ у пациентов с СД2.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика обследованных лиц

Исследование выполнено в соответствии с международными рекомендациями STREGA (STrengthening the REporting of Genetic Association Studies) на этнически гомогенной выборке (1461 человек) неродственных жителей Центральной России (преимущественно уроженцев Курской области) славянского происхождения. В исследование включен 1461 пациент с СД2 (486 мужчин и 975 женщин), получавший стационарное лечение в эндокринологическом отделении ОБУЗ Курской городской клинической больницы скорой медицинской помощи. Диагноз СД2 устанавливали на основе критериев ВОЗ [25]. Критерии включения в группу больных: наличие верифицированного врачом диагноза болезни, подтвержденного клиническими и лабораторно-инструментальными методами; возраст старше 35 лет, наличие письменного информированного согласия на участие в исследовании. Критерии исключения из основной выборки: выраженная степень декомпенсации СД2 или кома; наличие иммуноопосредованного или идиопатического СД 1-го типа; наличие гестационного СД; наличие специфических типов СД, таких как MODY; заболевания эндокринной части поджелудочной железы — панкреатит, травма или панкреатэктомия, опухоли поджелудочной железы; муковисцидоз, гемохроматоз, фиброкалькулезная панкреатопатия; эндокринопатии (акромегалия, синдром Кушинга, глюкагонома, феохромоцитомы, гипертиреоз, соматостатинома, альдостерома); наследственные болезни, сочетающиеся с СД (синдром Дауна, атаксия Фридрейха, хорей Гентингтона, синдром Клайнфельтера, синдром Лоренса-Муна-Бидля, миотоническая дистрофия, порфирия, синдром Прадера-Вилли, синдром Тернера); факт манифестации заболевания в возрасте до 35 лет; отсутствие письменного информированного согласия на участие в проекте. У 577 больных СД2 (110 мужчин и 467 женщин) была диагностирована ДНФ. Клинико-лабораторные характеристики участников исследования представлены в табл. 1.

Пациенты с ДНФ имели более высокие значения индекса массы тела, глюкозы крови натощак и более длительный стаж СД2. Скорость клубочковой фильтрации (СКФ), рассчитанная по формуле СКД-EPI, в этой группе

Таблица 1. Демографические, клинические и биохимические характеристики пациентов с СД2

Базовые характеристики	Пациенты с СД2 без ДНФ <i>n</i> = 884	Пациенты с СД2 с ДНФ <i>n</i> = 577	<i>p</i>
Возраст, среднее значение ± SD	58,88 ± 10,31	66,21 ± 8,54	< 0,0001
Мужчины, <i>n</i> (%)	376 (42,5)	110 (19,1)	< 0,0001
Женщины, <i>n</i> (%)	508 (57,5)	467 (80,9)	
Индекс массы тела (кг/м ²), среднее значение ± SD	31,65 ± 6,87	33,18 ± 6,30	< 0,0001
Длительность диабета, Ме (Q ₁ ; Q ₃)	7,0 (2,0; 12,0)	11,0 (6,0; 17,0)	< 0,0001
НbA1C (%), Ме (Q ₁ ; Q ₃)	9,0 (7,7; 10,5)	9,2 (7,8; 11,0)	0,09
Глюкоза крови натощак (ммоль/л), Ме (Q ₁ ; Q ₃)	12,0 (9,5; 15,0)	12,6 (10,0; 15,9)	0,026
Общий холестерин (ммоль/л), Ме (Q ₁ ; Q ₃)	5,02 (4,18; 5,90)	5,24 (4,33; 6,31)	0,0047
ЛНП (ммоль/л), Ме (Q ₁ ; Q ₃)	3,17 (2,50; 4,11)	3,10 (2,40; 4,07)	0,51
ЛВП (ммоль/л), Ме (Q ₁ ; Q ₃)	0,84 (0,72; 1,03)	0,85 (0,74; 1,03)	0,18
Триацилглицеролы (ммоль/л), Ме (Q ₁ ; Q ₃)	2,12 (1,54; 2,82)	2,25 (1,55; 3,10)	0,14
СКФ, мл/мин/1,72м ² , Ме (Q ₁ ; Q ₃)	73,7 (65,0; 83,6)	48,47 (43,0; 54,1)	< 0,0001

Примечание: Ме (Q₁; Q₃) — медиана, первый и третий квартили; СКФ — скорость клубочковой фильтрации (СКД-EPI); ЛНП — липопротеины низкой плотности; ЛВП — липопротеины высокой плотности.

больных была значимо ниже, чем у пациентов с СД2, не страдающих ДНФ (*p* < 0,0001).

Выделение ДНК и генотипирование

У всех участников исследования проводили забор 5 мл венозной крови натощак в вакуумные пробирки Vacuette с ЭДТА в качестве антикоагулянта. Геномную ДНК 1461 образца крови пациентов с СД2 из биобанка НИИ генетической и молекулярной эпидемиологии КГМУ выделяли колоночным методом с использованием наборов реагентов Biolabmix (Россия). Качество выделенной ДНК оценивали по степени чистоты и концентрации раствора на спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). Все анализируемые образцы ДНК были разведены деионизированной водой до концентрации 10 нг/мкл при A260/280 = 1,5–2,0.

Отбор однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в гене ДНК-гликозилазы *OGG1* проводили с использованием геномного браузера Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) и биоинформатических инструментов веб-сервера SNPinfo (<https://snpinform.nih.gov/>), включая GenePipe, FuncPred и TagSNP, ресурса atSNP (<http://atsnp.biostat.wisc.edu/>) и на основании оценки гаплотипической структуры гена (отбор tagSNPs, $r^2 \geq 0,8$), частоты минорного аллеля (MAF > 5%) в европейских популяциях проекта HapMap, параметров, необходимых для наиболее полного охвата вариативности гена и включения функционально значимых полиморфных локусов, имеющих регуляторный потенциал и способных влиять на связывание транскрипционных факторов и микроРНК, сплайсинг и/или активность белкового продукта гена *OGG1*. Все пять отобранных вариантов rs2072668, rs1052133, rs293795, rs2304277, rs6443265 влияли на аффинность транскрипционных факторов в соответствующих участках ДНК, rs1052133 и rs293795 расположены в сайтах связывания микроРНК. SNP rs2072668 (C>G) является вариантом сплайсинга полипиримидинового тракта, rs1052133 (C>G) — миссенс-вариант, приводящий к замене серина на цистеин в 326 положении белка, rs293795 (A>G) и rs6443265 (T>C) расположены в интронах гена *OGG1*, rs2304277 (G>A) — в некодирующем транскрипте экзоне *OGG1*.

Для дизайна праймеров использовали программу Primer3web version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>).

Последовательности аллель-специфичных флуоресцентно меченых зондов были подобраны на основе нуклеотидной последовательности гена *OGG1* (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000114026;r=3:9749944-9788219). Праймеры и зонды, представленные в табл. 2, синтезированы компанией «Синтол» (Россия).

Общий объем реакционной смеси составил 14,25 мкл. При этом к 1 мкл раствора ДНК с концентрацией 10 нг/мкл добавляли 13,25 мкл смеси ПЦР, содержащей 9,4 мкл ddH₂O, 1,3 мкл раствора MgCl₂ («Евроген», Россия; массовая концентрация 2,5%), 1,3 мкл ПЦР-буфера («Биолабмикс», Россия), 0,2 мкл смеси дНТФ («Евроген», Россия; концентрация 2 ммоль/л), 0,05 мкл раствора прямого и обратного праймера (концентрация 100 пкмоль/мкл), 0,025 мкл раствора каждого TaqMan-зонда (концентрация 100 пкмоль/мкл) и 0,11 мкл Taq ДНК-полимеразы («Биолабмикс», Россия) с горячим стартом (концентрация 5 Ед/мкл). ПЦР проводили с помощью прибора CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США) при следующем режиме: 10 мин при 95 °С, амплификация 38 циклов, включающая 15 с при 95 °С, 30 с при *t* = 53 °С и 60 с при подобранной экспериментально температуре отжига, индивидуальной для каждого SNP (табл. 2).

Идентификацию референсного и минорного аллелей изучаемых SNP проводили на основании сравнения интенсивности флуоресценции красителей FAM и ROX соответственно. Анализ результатов генотипирования проводили с помощью программного обеспечения для амплификатора CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США) версии Bio-Rad CFX Manager 2.1, которое представляет результаты генотипирования в виде распределения аллелей. На рис. 1 представлен пример детекции генотипов по локусу rs2304277 гена *OGG1*: генотипы rs2304277-G/G показаны оранжевым цветом, генотипы rs2304277-G/A — зеленым, генотипы rs2304277-A/A — синим цветом, черным ромбом показан отрицательный контроль.

Концентрации глюкозы, гликированного гемоглобина, креатинина, триглицеридов, общего холестерина и его подфракций определяли наборами фирмы «Диакон-ДС» на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Ciima MC-15 (RAL, Испания). Для функционального аннотирования вариантов ДНК использовали онлайн-ресурсы GTEEx Portal (<https://www.gtexportal.org/home/>), atSNP (<http://atsnp.biostat.wisc.edu/>), Gene Ontology

Таблица 2. Последовательности праймеров и аллель-специфичных флуоресцентных зондов для генотипирования методом ПЦР в реальном времени

Ген	SNP	Олигонуклеотид	Последовательность праймера/зонда	<i>t</i> отжига при ПЦР
<i>OGG1</i>	rs2072668 C>G	F	5'-ACAGTAACCCAGAGTGAAGG-3'	55 °C
		R	5'-CCTGGGGCTTGTCTAGGG-3'	
		FAM	5'-FAM-CCACAAGGGCTCATTG-RTQ1-3'	
		ROX	5'-ROX-CCACAAGGGCTCATTG-BHQ-3'	
	rs1052133 C>G	F	5'-CTAGTCTCACAGCCCTGAC-3'	56 °C
		R	5'-GTGCCCCATCTAGCCTTCC-3'	
		FAM	5'-FAM-CCGACCTGCGCCAATC-RTQ1-3'	
		ROX	5'-ROX-CCGACCTGCGCCAATG-BHQ-3'	
	rs293795 A>G	F	5'-AGACAGCGCTAAGGATGGTT-3'	56 °C
		R	5'-CTCCCCTTCCCTCCCTGAA-3'	
		FAM	5'-FAM-TGAGGAGTGGTAGGGAA-RTQ1-3'	
		ROX	5'-ROX-TGAGGAGTGGTAGGGAG-BHQ-3'	
	rs2304277 G>A	F	5'-TCTGGAATAGAGAAGGTGTTGGG-3'	56 °C
		R	5'-GGACTCCTCCCCATCCCTA-3'	
		FAM	5'-FAM-AGTTACTGTGTGCCAG-RTQ1-3'	
		ROX	5'-ROX-AGTTACTGTGTGCCAA-BHQ-3'	
	rs6443265 T>C	F	5'-AGAGACTTGTTCGGGTTGCT-3'	54 °C
		R	5'-GGGAATCCATCACAGTGCCT-3'	
		FAM	5'-FAM-ATGTCACCTATACCTT-RTQ1-3'	
		ROX	5'-ROX-ATGTCACCTATACCTC-BHQ-3'	

Примечание: F — прямой праймер, R — обратный праймер, FAM — референсный аллель-специфичный флуоресцентно меченый зонд, ROX — минорный аллель-специфичный флуоресцентно меченый зонд.

Resource (<https://geneontology.org/>), mQTLdb [<https://www.mqtlb.org/>] и VannoPortal (<http://www.mulinlab.org/vportal/index.html>).

Статистическая обработка данных

Анализ ассоциаций изучаемых SNP и гаплотипов с риском ДНФ выполняли методом логистической регрессии с поправкой на пол, возраст и ИМТ с помощью программы SNPStats [26], анализ ассоциаций диглотипов *OGG1* с ДНФ, а также расчет количественных показателей проводили с помощью программы STATISTICA v10.0. (StatSoft, США). Ассоциацию считали значимой при $p < 0,05$. Для проверки нормальности распределения биохимических показателей использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Переменные, имеющие нормальное распределение, были описаны с использованием среднего значения и стандартного отклонения. В качестве теста статистической значимости использовали тест Стьюдента. Показатели с ненормальным распределением описывали с использованием медианы (Median), первого (Q_1) и третьего (Q_3) квартилей, в виде: Median [Q_1 ; Q_3]. В качестве теста статистической значимости в таких случаях применяли критерий Манна-Уитни. Обнаруженные отличия групп считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованные SNP находились в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Результаты анализа ассоциаций полиморфных вариантов гена *OGG1* с ДНФ представлены в табл. 3. Генотип rs293795-G/G (OR = 1,97, 95% CI = 1,23-3,16, $p = 0,007$) *OGG1* ассоциировался с повышенным риском ДНФ на фоне СД2 независимо от пола, возраста и индекса массы тела пациентов.

На следующем этапе был выполнен анализ ассоциаций парных комбинаций генотипов (диглотипов) *OGG1* с предрасположенностью к ДНФ, статистически значимые результаты которого представлены в табл. 4.

Установлено, что носительство генотипа G/G rs293795 ассоциировалось с повышенным риском ДНФ в сочетании с генотипами rs2072668-C/C (OR = 1,68, 95% CI = 1,10-2,56, $p = 0,015$), rs1052133-C/C (OR = 1,64, 95% CI = 1,07-2,51, $p = 0,021$), rs2304277-G/G (OR = 1,68, 95% CI = 1,10-2,56, $p = 0,015$) и rs6443265-C/C (OR = 1,64, 95% CI = 1,06-2,54, $p = 0,025$). Гетерозиготный генотип rs293795-A/G также детерминировал риск ДНФ в комбинации с генотипами rs2072668-C/G (OR = 1,48, 95% CI = 1,06-2,08, $p = 0,022$) и rs1052133-C/G (OR = 1,42, 95% CI = 1,01-1,99, $p = 0,043$), тогда как сочетание гомозиготного по референсному аллелю генотипа rs293795-A/A с генотипом rs6443265-T/C обладало протективным эффектом в отношении ДНФ: OR = 0,67, 95% CI = 0,49-0,92, $p = 0,013$ (табл. 4).

Анализ неравновесия по сцеплению (LD) изучаемых локусов гена *OGG1* (табл. 5) показал, что rs293795 находился в положительном неравновесии по сцеплению с rs6443265 ($D = 0,1561$, $D' = 0,9541$, $p < 2 \times 10^{-16}$). В то же время rs293795 находился в отрицательном неравновесии по сцеплению с rs2072668 ($D = -0,0514$, $D' = 0,9990$, $p < 2 \times 10^{-16}$), rs1052133 ($D = -0,0512$, $D' = 0,9989$, $p < 2 \times 10^{-16}$) и с rs2304277 ($D = -0,0406$, $D' = 0,9982$, $p < 2 \times 10^{-16}$).

Гаплотипический анализ гена *OGG1* позволил выявить пять частых гаплотипов (табл. 6). Гаплотип H2 rs2072668C-rs1052133C-rs293795G-rs2304277G-rs6443265C, имеющий в своем составе минорный аллель rs293795-G, ассоциировался с повышенным риском ДНФ: OR = 1,30, 95% CI = 1,06-1,60, $p = 0,012$.

Кроме того, были установлены 12 редких гаплотипов *OGG1* с частотой менее 1%: H6 CCGGT, H7 GGAGC, H8 GGAAC, H9 GCAAT, H10 CGAGC, H11 CCGAT, H12 GCAGT,

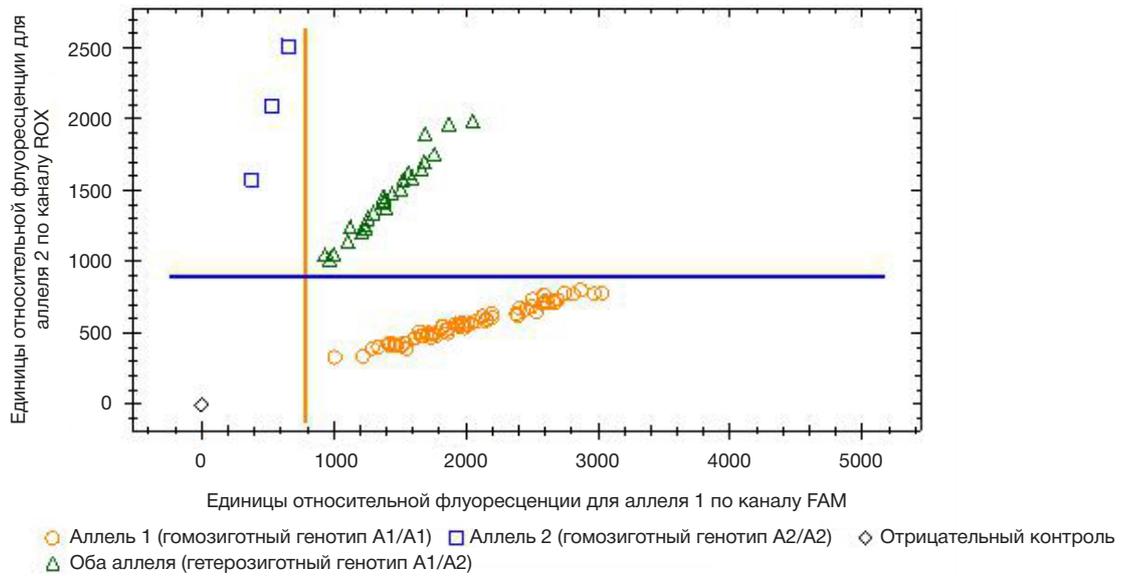


Рис. 1. Распределение генотипов по локусу rs2304277 гена OGG1

H13 CGAAT, H14 GGGGT, H15 CCGAC, H16 CCAAC и H17 CGGAC, которые (графа «редкие» в табл. 6) на риск ДНФ при СД2 не влияли ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Восстановление окисленных азотистых оснований ДНК в первую очередь осуществляется посредством пути эксцизионной репарации оснований [18]. Из-за разнообразия размеров и форм повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом, для поддержания геномной стабильности и борьбы с различными модификациями оснований развился разнообразный набор ДНК-гликозилаз. На основе их структурных характеристик ДНК-гликозилазы делят на четыре суперсемейства: 1) урацил-ДНК-гликозилазы (UDG, SMUG1, TDG); 2) гликозилазы спираль-шпилька-спираль (HhH) — NTHL1,

OGG1 и MUTYH; 3) 3-метил-пуриновые гликозилазы (MPG); 4) гликозилазы, подобные эндонуклеазе VIII (NEIL) — NEIL1, NEIL2 и NEIL3 [27].

Фермент OGG1 относится ко второму семейству, является β -элиминирующей бифункциональной ДНК-гликозилазой, поскольку обладает и гликозилазной, и лиазной активностью и отвечает за удаление окисленной формой гуанина 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина (8-охоG) [28]. Образующийся в результате апуриновый (AP) сайт распознается AP-эндонуклеазой APEX1, инициирующей репарацию путем расщепления сахарофосфатного остова. ДНК-полимераза бета POLB заполняет пробел и, образуя комплекс с белком XRCC1 и ДНК-лигазой 3 LIG3, вставляет нужное комплементарное основание в AP-сайт [9].

Нарушения описанного процесса репарации усугубляют метаболические нарушения, развивающиеся при окислительном стрессе в условиях хронической

Таблица 3. Ассоциации полиморфных вариантов гена OGG1 с риском развития ДНФ у пациентов с СД2

SNP ID гена OGG1	Генотип	Частоты генотипов пациентов с СД2		OR ² (95% CI)	P ³
		без ДНФ n (%) ¹	с ДНФ n (%) ¹		
rs2072668 C>G	C/C	561 (63,7%)	350 (63%)	1,00	0,69
	C/G	274 (31,1%)	184 (33,1%)	1,05 (0,82–1,34)	
	G/G	46 (5,2%)	22 (4%)	0,81 (0,45–1,44)	
rs1052133 C>G	C/C	557 (63,4%)	350 (63,1%)	1,00	0,83
	C/G	278 (31,7%)	185 (33,3%)	1,01 (0,78–1,29)	
	G/G	43 (4,9%)	20 (3,6%)	0,83 (0,46–1,53)	
rs293795 A>G	A/A	517 (59%)	288 (51,8%)	1,00	0,007
	A/G	314 (35,8%)	220 (39,6%)	1,28 (1,00–1,63)	
	G/G	45 (5,1%)	48 (8,6%)	1,97 (1,23–3,16)	
rs2304277 G>A	G/G	619 (70,3%)	399 (71,8%)	1,00	0,68
	G/A	228 (25,9%)	140 (25,2%)	0,90 (0,69–1,18)	
	A/A	33 (3,8%)	17 (3,1%)	0,83 (0,43–1,62)	
rs6443265 T>C	T/T	374 (42,5%)	227 (40,8%)	1,00	0,31
	T/C	415 (47,2%)	258 (46,4%)	1,04 (0,81–1,33)	
	C/C	90 (10,2%)	71 (12,8%)	1,35 (0,92–1,99)	

Примечание: ¹ — абсолютное число и процент лиц с определенным генотипом; ² — отношение шансов и 95%-й доверительный интервал ассоциации SNP с фенотипом с поправкой на пол, возраст и ИМТ; ³ — уровень значимости ассоциации по кодоминантной модели с поправкой на пол, возраст и ИМТ.

Таблица 4. Статистически значимые ассоциации диплотипов гена *OGG1* с риском развития ДНФ у пациентов с СД2

Комбинации генотипов	Больные СД2 с ДНФ ¹		Больные СД2 без ДНФ ¹		<i>P</i> ²	OR (95% CI) ³
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
rs293795-G/G × rs2072668-C/C	48	8,35	45	5,14	0,015	1,68 (1,10–2,56)
rs293795-G/G × rs1052133-C/C	47	8,19	45	5,15	0,021	1,64 (1,07–2,51)
rs293795-G/G × rs2304277-G/G	48	8,35	45	5,14	0,015	1,68 (1,10–2,56)
rs293795-G/G × rs6443265-C/C	44	7,65	42	4,81	0,025	1,64 (1,06–2,54)
rs293795-A/G × rs2072668-C/G	72	12,52	77	8,8	0,022	1,48 (1,06–2,08)
rs293795-A/G × rs1052133-C/G	71	12,37	79	9,05	0,043	1,42 (1,01–1,99)
rs293795-A/A × rs6443265-T/C	67	11,65	143	16,36	0,013	0,67 (0,49–0,92)

Примечание: ¹ — абсолютное число и процент лиц с определенным генотипом; ² — уровень значимости; ³ — отношение шансов и 95%-й доверительный интервал. Подчеркиванием показаны минорные аллели.

гипергликемии и способствуют гибели клеток. Так, при иммуногистохимическом исследовании аутопсийного материала поджелудочной железы пациентов с СД2 выявлено, что снижение объемной плотности бета-клеток значимо коррелировало именно с маркерами окислительного повреждения ДНК — 8-oxodG и фосфорилированным по 139-му остатку серина гистонном γ H2AX, тогда как ассоциации с маркерами стресса эндоплазматического ретикулума С/ЕВР- β и нарушения аутофагии Р62 отсутствовали [29–30]. Опасность накопления 8-oxoG состоит в том, что он может образовывать пару с цитозином аналогично гуанину, в то время как вращение вокруг его N-гликозидной связи делает возможным образование пары с аденином [31]. Стабильность син-конформации 8-oxoG в дуплексной ДНК приводит к увеличению трансверсионных мутаций G:C → T:A во время последующих раундов репликации. Другое окислительное повреждение гуанина, а именно 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формаимидопиримидин (ФаруГ), возникает в результате фрагментации имидазольного кольца пурина и чаще, чем 8-oxoG, приводит к трансверсии G:C → T:A [32–33]. Обращает на себя внимание факт влияния проокислительного статуса клетки на экспрессию ДНК-гликозилаз: перекись водорода снижает экспрессию *OGG1*, тогда как N-ацетилцистеин снижает количество продукта окисления 8-oxodG и увеличивает экспрессию фермента *OGG1* [34–36].

Согласно клиническим и экспериментальным исследованиям, loss-of-function однонуклеотидные варианты гена *OGG1* связаны со снижением генетической стабильности и высоким риском канцерогенеза [21]. В частности, rs1052133 ассоциируется с предрасположенностью к хроническому миелоидному лейкозу [37], rs1052133 и rs2072668 — к раку молочной железы [38–39], rs2304277 — к

раку яичников [40]. Полиморфный вариант rs1052133 гена *OGG1* ассоциируется с СД2 у американцев мексиканского происхождения [23] и японцев [24]. Дефицит *OGG1* у мышей приводит к ожирению, жировому гепатозу, нарушенной толерантности к глюкозе и метаболической дисфункции [41].

Нам не удалось найти данные о вовлеченности rs2072668, rs293795, rs2304277, rs6443265 *OGG1* в развитие сахарного диабета и его осложнений в литературе. Выполненное нами исследование установило ассоциации генотипа rs293795-G/G, семи диплотипов rs293795-G/G × rs2072668-C/C, rs293795-G/G × rs1052133-C/C, rs293795-G/G × rs2304277-G/G, rs293795-G/G × rs6443265-C/C, rs293795-A/G × rs2072668-C/G, rs293795-A/G × rs1052133-C/G, rs293795-A/A × rs6443265-T/C и гаплотипа rs2072668C-rs1052133C-rs293795G-rs2304277G-rs6443265C гена *OGG1* с предрасположенностью к ДНФ на фоне СД2. Повышенный риск ДНФ был связан с носительством минорного аллеля rs293795-G, который по данным транскриптомного анализа GTEx Portal ассоциируется со снижением экспрессии гена *OGG1* (<https://www.gtexportal.org/home/>). Анализ аффинности транскрипционных факторов в участках SNP (<http://atsnp.biostat.wisc.edu/>) показал, что аллель G rs293795 формирует сайты связывания для 25 белков: BCL ($p = 0,0021$), BHLHE40 ($p = 0,0045$), CACBP ($p = 0,0014$), CHD2 ($p < 0,0001$), E2F1 ($p = 0,0046$), EGR ($p = 0,0018$), EGR1 ($p = 0,0088$), ELF1 ($p = 0,0012$), MAZ ($p = 0,0081$), MEIS1 ($p = 0,0055$), MYC ($p = 0,0000029$), NFE2 ($p < 0,0001$), PLAG1 ($p = 0,0006$), RAD21 ($p = 0,0068$), REST ($p < 0,0001$), SREBF ($p = 0,002$), TATA ($p = 0,0077$), TBX20 ($p = 0,0069$), TFAP2 ($p = 0,0091$), TLX1:NFC ($p = 0,0061$), WT1 ($p = 0,0021$), YY1 ($p = 0,0032$), ZNF219 ($p = 0,00043$), ZNF740 ($p = 0,0056$), ZNF784 ($p = 0,0026$). Общие термины генных онтологий перечисленных транскрипционных факторов (The Gene

Таблица 5. Анализ неравновесия по сцеплению изучаемых локусов гена *OGG1*

SNP	rs2072668	rs1052133	rs293795	rs2304277	rs6443265
rs2072668	–	0,1613	–0,0514	0,1275	–0,0665
	–	0,9898	0,9990	0,9854	0,9373
rs1052133	–	–	–0,0512	0,1263	–0,065
	–	–	0,9989	0,9758	0,9206
rs293795	–	–	–	–0,0406	0,1561
	–	–	–	0,9982	0,9541
rs2304277	–	–	–	–	–0,0527
	–	–	–	–	0,9402

Примечание: в серых ячейках приведены показатели D, в белых — D'; $p < 2 \times 10^{-16}$.

Таблица 6. Анализ ассоциаций гаплотипов *OGG1* с риском ДНФ у пациентов с СД2

SNPs	rs2072668	rs1052133	rs293795	rs2304277	rs6443265	Частота гаплотипов у пациентов с СД2		OR ² (95% CI)	p ³
						без ДНФ	с ДНФ		
<i>H1</i>	C	C	A	G	T	0,4522	0,4378	1	–
<i>H2</i>	C	C	G	G	C	0,2231	0,2676	1,30 (1,06–1,60)	0,012
<i>H3</i>	G	G	A	A	T	0,1609	0,1497	0,99 (0,78–1,26)	0,93
<i>H4</i>	C	C	A	G	C	0,1079	0,08	0,80 (0,58–1,10)	0,17
<i>H5</i>	G	G	A	G	T	0,0384	0,0443	1,29 (0,85–1,96)	0,24
<i>редкие</i>	*	*	*	*	*	0,0063	0,0073	1,04 (0,52–2,08)	0,91
Общий $p = 0,028$									

Примечание: ¹ — гаплотип; ² — отношение шансов и 95%-й доверительный интервал ассоциации гаплотипа с фенотипом с поправкой на пол, возраст и ИМТ; ³ — уровень значимости ассоциации с поправкой на пол, возраст и ИМТ.

Ontology Resource <https://geneontology.org/> — регуляция пролиферации мезангиальных клеток метанефральных клубочков ($p = 8,97 \times 10^{-7}$), положительная регуляция пролиферации клеток, участвующих в развитии почек ($p = 3,22 \times 10^{-5}$), и отрицательная регуляция экспрессии генов посредством метилирования CpG-островков ($p = 1,07 \times 10^{-4}$). Ассоциация аллеля rs293795-G с гиперметилированием CpG-островков гена *OGG1* (т. е. с низкой транскрипционной активностью гена) у взрослых установлена и в метиломном анализе, результаты которого депонированы в онлайн-базе mQTLdb [42].

По данным проекта VannoPortal (<http://www.mulinlab.org/vportal/index.html>) в ткани почек rs293795 служит маркером модификации гистона H3K36me3, участвующей в ответе на повреждения ДНК и сохраняющей репрессивный статус хроматина независимо от ацетилирования гистонов [43]. Другая важная роль H3K36me3 в экспрессии генов заключается в регуляции сплайсинга РНК [44], для чего H3K36me3 образует адаптерную систему с геном MRG15, привлекая таким образом белок, связывающий полипиримидиновый тракт регулятора сплайсинга PTB [45].

ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о вовлеченности полиморфизма гена репарации окислительных повреждений ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы в развитие диабетической нефропатии у пациентов с СД2. Данные функционального аннотирования ассоциированного с повышенным риском ДНФ полиморфного варианта rs293795 в совокупности указывают на специфичное для ткани почек снижение функции фермента *OGG1* у носителей минорного аллеля rs293795-G, что в условиях повышенной нагрузки на систему репарации при гипергликемии и окислительном стрессе может способствовать классическим структурным и функциональным повреждениям сосудов и клубочков, характерным для ДНФ. Проведение дальнейших исследований, в том числе на «животных» моделях СД2, позволит дать системную оценку роли генов ДНК-гликозилаз в инициации и прогрессировании диабетической болезни почек и сформировать тем самым более глубокое понимание патогенеза этого микрососудистого осложнения сахарного диабета.

Литература

- Reed J, Bain S, Kanamarlapudi V. A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2021; 14: 3567–602. PMID: 34413662. DOI: 10.2147/DMSO.S319895.
- Duncan BB, Magliano DJ, Boyko EJ. IDF diabetes atlas 11th edition 2025: global prevalence and projections for 2050. *Nephrol Dial Transplant.* 2025. DOI: 10.1093/ndt/gfaf177.
- Gregg EW, Sattar N, Ali MK. The changing face of diabetes complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016; 4 (6): 537–47. PMID: 27156051. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30010-9.
- Selby NM, Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes Obes Metab.* 2020; Suppl 1: 3–15. PMID: 32267079. DOI: 10.1111/dom.14007.
- Kopel J, Pena-Hernandez C, Nugent K. Evolving spectrum of diabetic nephropathy. *World J Diabetes.* 2019; 10: 269–79. DOI: 10.4239/wjcd.v10.i5.269.
- Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed Res Int.* 2021; 2021: 16740. DOI: 10.1155/2021/1497449.
- Azarova I, Klyosova E, Polonikov A. Single Nucleotide Polymorphisms of the RAC1 Gene as Novel Susceptibility Markers for Neuropathy and Microvascular Complications in Type 2 Diabetes. *Biomedicines.* 2023; 11 (3): 981. PMID: 36979960. DOI: 10.3390/biomedicines11030981.
- Gallagher H, Suckling RJ. Diabetic nephropathy: where are we on the journey from pathophysiology to treatment? *Diabetes Obes Metab.* 2016; 18 (7): 641–7. PMID: 26743887. DOI: 10.1111/dom.12630.
- Grindel A, Guggenberger B, Eichberger L, Pöppelmeyer C, Gschaider M, Tosevska A et al. Oxidative Stress, DNA Damage and DNA Repair in Female Patients with Diabetes Mellitus Type 2. *PLoS One.* 2016; 11 (9): e0162082. PMID: 27598300. DOI: 10.1371/journal.pone.0162082.
- Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* 2019; 177: 37–45. PMID: 29604323. DOI: 10.1016/j.mad.2018.03.013.
- González-Quiroz M, Blondel A, Sagredo A, Hetz C, Chevet E, Pedoux R. When Endoplasmic Reticulum Proteostasis Meets the DNA Damage Response. *Trends Cell Biol.* 2020; 30 (11): 881–91. PMID: 33036871. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.09.002.
- Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H. The Role of Oxidative Stress in Pancreatic — Cell Dysfunction in Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (4): 1509. PMID: 33546200. DOI: 10.3390/ijms22041509.
- Uphoff S, Lord ND, Okumus B, Potvin-Trottier L, Sherratt DJ, Paulsson J. Stochastic activation of a DNA damage response causes cell-to-cell mutation rate variation. *Science.* 2016; 351 (6277): 1094–7. DOI: 10.1126/science.aac9786.
- Gu S, Li J, Li S, Cao J, Bu J, Ren Y, et al. Efficient replacement of long DNA fragments via non-homologous end joining at non-coding regions. *J Mol Cell Biol.* 2021; 13 (1): 75–77. DOI: 10.1093/jmcb/mjaa051.

15. Demin AA, Hirota K, Tsuda M, Adamowicz M, Hailstone R, Brazina J, et al. XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair. *Mol Cell*. 2021; 81 (14): 3018–30.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.05.009.
16. Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman LC, Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett*. 2008; 266 (1): 60–72. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.02.032.
17. Gartner A, Engebrecht J. DNA repair, recombination, and damage signaling. *Genetics*. 2022; 220 (2): iyab178. PMID: 35137093. DOI: 10.1093/genetics/iyab178.
18. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*. 2007; 447 (7147): 941–50. PMID: 17581577. DOI: 10.1038/nature05978.
19. Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol*. 2018; 14: 669–78. PMID: 29175754. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.008.
20. Fleming AM, Ding Y, Burrows CJ. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017; 114 (10): 2604–9. DOI: 10.1073/pnas.1619809114.
21. Boiteux S, Coste F, Castaing B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic Biol Med*. 2017; 107: 179–201. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.042.
22. Kumar V, Agrawal R, Pandey A, Kopf S, Hoeffgen M, Kaymak S, et al. Compromised DNA repair is responsible for diabetes-associated fibrosis. *EMBO J*. 2020; 39 (11): e103477. PMID: 32338774. DOI: 10.15252/embj.2019103477.
23. Thameem F, Puppala S, Lehman DM, Stern MP, Blangero J, Abboud HE, et al. The Ser(326)Cys polymorphism of 8-oxoguanine glycosylase 1 (OGG1) is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Hum Hered*. 2010; 70 (2): 97–101. PMID: 20606456. DOI: 10.1159/000291964.
24. Daimon M, Oizumi T, Toriyama S, Karasawa S, Jimbu Y, Wada K, et al. Association of the Ser326Cys polymorphism in the OGG1 gene with type 2 DM. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 386 (1): 26–29. PMID: 19486888. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.119.
25. World Health Organization. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation (WHO/NMH/CHP/CPM/11.1). World Health Organization; 2011.
26. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006; 22 (15): 1928–9. PMID: 16720584. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl268.
27. Mullins EA, Rodriguez AA, Bradley NP, Eichman BF. Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway. *Trends Biochem Sci*. 2019; 44 (9): 765–81. PMID: 31078398. DOI: 10.1016/j.tibs.2019.04.006.
28. Cai H, Wang W, Li M, Jin J, Ge Z. Expression of nucleic acid oxidation metabolites 8-Oxo-GSn and β -amyloid protein in the urine and cerebral tissues of diabetic rats. *Journal of King Saud University — Science*. 2022; 34 (3): 101776. DOI.org/10.1016/j.jksus.2021.101776.
29. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia*. 2002; 45 (1): 85–96. PMID: 11845227. DOI: 10.1007/s125-002-8248-z.
30. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Tsuboi K, Osonoi S, Yoshida T et al. Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of β -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2014; 37 (7): 1966–74. PMID: 24705612. DOI: 10.2337/dc13-2018.
31. Ovcherenko SS, Shernyukov AV, Nasonov DM, Endutkin AV, Zharkov DO, Bagryanskaya EG. Dynamics of 8-Oxoguanine in DNA: Decisive Effects of Base Pairing and Nucleotide Context. *J Am Chem Soc*. 2023; 145 (10): 5613–7. PMID: 36867834. DOI: 10.1021/jacs.2c11230.
32. Whitaker AM, Schaich MA, Smith MR, Flynn TS, Freudenthal BD. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2017; 22 (9): 1493–522. PMID: 28199214. DOI: 10.2741/4555.
33. Shikazono N, Akamatsu K. Mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) is influenced by nearby clustered lesions. *Mutat Res*. 2018; 810: 6–12. PMID: 29870902. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2018.05.001.
34. Simone S, Gorin Y, Velagapudi C, Abboud HE, Habib SL. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. *Diabetes*. 2008; 57 (10): 2626–36. PMID: 18599524. DOI: 10.2337/db07-1579.
35. Manoel-Caetano FS, Xavier DJ, Evangelista AF, Takahashi P, Collares CV, Puthier D, et al. Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. *Gene*. 2012; 511 (2): 151–60. PMID: 23036710. DOI: 10.1016/j.gene.2012.09.090.
36. Merez A, Markiewicz L, Sliwiska A, Kosmowski M, Kasznicki J, Drzewoski J, et al. Analysis of oxidative DNA damage and its repair in Polish patients with diabetes mellitus type 2: Role in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Adv Med Sci*. 2015; 60 (2): 220–30. PMID: 25932787. DOI: 10.1016/j.advms.2015.04.001.
37. Hassan FM. OGG1 rs1052133 Polymorphism and Genetic Susceptibility to Chronic Myelogenous Leukaemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2019; 20 (3): 925–8. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.3.925.
38. Alanazi M, Pathan AAK, Shaik JP, Alhadheq A, Khan Z, Khan W, et al. The hOGG1 Ser326Cys gene polymorphism and breast cancer risk in Saudi population. *Pathology and Oncology Research*. 2017; 23 (3): 525–35.
39. Kim KY, Han W, Noh DY, Kang D, Kwack K. Impact of genetic polymorphisms in base excision repair genes on the risk of breast cancer in a Korean population. *Gene*. 2013; 532 (2): 192–6. PMID: 24076439. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.069.
40. Osorio A, Milne RL, Kuchenbaecker K, Vaclava T, Pita G, Alonso R, et al. DNA glycosylases involved in base excision repair may be associated with cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *PLoS Genet*. 2014; 10: e1004256. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004256.
41. Sampath H, Vartanian V, Rollins MR, Sakumi K, Nakabeppu Y, Lloyd RS. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e51697. PMID: 23284747. DOI: 10.1371/journal.pone.0051697.
42. Gaunt TR, Shihab HA, Hemani G, Min JL, Woodward G, Lyttleton O, et al. Systematic identification of genetic influences on methylation across the human life course. *Genome Biology*. 2016; 17: 61. DOI: 10.1186/s13059-016-0926-z.
43. Sun Z, Zhang Y, Jia J, Fang Y, Tang Y, Wu H, et al. H3K36me3, message from chromatin to DNA damage repair. *Cell Biosci*. 2020; 10: 9. PMID: 32021684. DOI: 10.1186/s13578-020-0374-z.
44. Barash Y, Calarco JA, Gao W, Pan Q, Wang X, Shai O, et al. Deciphering the splicing code. *Nature*. 2010; 465 (7294): 53–59. PMID: 20445623. DOI: 10.1038/nature09000.
45. Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science*. 2010; 327 (5968): 996–1000. PMID: 20133523. DOI: 10.1126/science.1184208.

References

1. Reed J, Bain S, Kanamarlapudi V. A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2021; 14: 3567–602. PMID: 34413662. DOI: 10.2147/DMSO.S319895.
2. Duncan BB, Magliano DJ, Boyko EJ. IDF diabetes atlas 11th edition 2025: global prevalence and projections for 2050. *Nephrol Dial Transplant*. 2025. DOI: 10.1093/ndt/gfaf177.
3. Gregg EW, Sattar N, Ali MK. The changing face of diabetes

- complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016; 4 (6): 537–47. PMID: 27156051. DOI: 10.1016/S2213-8587(16)30010-9.
4. Selby NM, Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: Diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines. *Diabetes Obes Metab.* 2020; Suppl 1: 3–15. PMID: 32267079. DOI: 10.1111/dom.14007.
 5. Kopel J, Pena-Hernandez C, Nugent K. Evolving spectrum of diabetic nephropathy. *World J Diabetes.* 2019; 10: 269–79. DOI: 10.4239/wjd.v10.i5.269.
 6. Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *BioMed Res Int.* 2021; 2021: 16740. DOI: 10.1155/2021/1497449.
 7. Azarova I, Klyosova E, Polonikov A. Single Nucleotide Polymorphisms of the RAC1 Gene as Novel Susceptibility Markers for Neuropathy and Microvascular Complications in Type 2 Diabetes. *Biomedicines.* 2023; 11 (3): 981. PMID: 36979960. DOI: 10.3390/biomedicines11030981.
 8. Gallagher H, Suckling RJ. Diabetic nephropathy: where are we on the journey from pathophysiology to treatment? *Diabetes Obes Metab.* 2016; 18 (7): 641–7. PMID: 26743887. DOI: 10.1111/dom.12630.
 9. Grindel A, Guggenberger B, Eichberger L, Pöppelmeyer C, Gschaider M, Tosevska A et al. Oxidative Stress, DNA Damage and DNA Repair in Female Patients with Diabetes Mellitus Type 2. *PLoS One.* 2016; 11 (9): e0162082. PMID: 27598300. DOI: 10.1371/journal.pone.0162082.
 10. Barnes RP, Fouquier E, Opreko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev.* 2019; 177: 37–45. PMID: 29604323. DOI: 10.1016/j.mad.2018.03.013.
 11. González-Quiroz M, Blondel A, Sagredo A, Hetz C, Chevret E, Pedoux R. When Endoplasmic Reticulum Proteostasis Meets the DNA Damage Response. *Trends Cell Biol.* 2020; 30 (11): 881–91. PMID: 33036871. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.09.002.
 12. Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H. The Role of Oxidative Stress in Pancreatic — Cell Dysfunction in Diabetes. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (4): 1509. PMID: 33546200. DOI: 10.3390/ijms22041509.
 13. Uphoff S, Lord ND, Okumus B, Potvin-Trottier L, Sherratt DJ, Paulsson J. Stochastic activation of a DNA damage response causes cell-to-cell mutation rate variation. *Science.* 2016; 351 (6277): 1094–7. DOI: 10.1126/science.aac9786.
 14. Gu S, Li J, Li S, Cao J, Bu J, Ren Y, et al. Efficient replacement of long DNA fragments via non-homologous end joining at non-coding regions. *J Mol Cell Biol.* 2021; 13 (1): 75–77. DOI: 10.1093/jmcb/mjaa051.
 15. Demin AA, Hirota K, Tsuda M, Adamowicz M, Hailstone R, Brazina J, et al. XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair. *Mol Cell.* 2021; 81 (14): 3018–30.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.05.009.
 16. Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman LC, Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Lett.* 2008; 266 (1): 60–72. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.02.032.
 17. Gartner A, Engebrecht J. DNA repair, recombination, and damage signaling. *Genetics.* 2022; 220 (2): iyab178. PMID: 35137093. DOI: 10.1093/genetics/iyab178.
 18. David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.* 2007; 447 (7147): 941–50. PMID: 17581577. DOI: 10.1038/nature05978.
 19. Ba X, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. *Redox Biol.* 2018; 14: 669–78. PMID: 29175754. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.008.
 20. Fleming AM, Ding Y, Burrows CJ. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017; 114 (10): 2604–9. DOI: 10.1073/pnas.1619809114.
 21. Boiteux S, Coste F, Castaing B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic Biol Med.* 2017; 107: 179–201. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.042.
 22. Kumar V, Agrawal R, Pandey A, Kopf S, Hoeffgen M, Kaymak S, et al. Compromised DNA repair is responsible for diabetes-associated fibrosis. *EMBO J.* 2020; 39 (11): e103477. PMID: 32338774. DOI: 10.15252/embj.2019103477.
 23. Thameem F, Puppala S, Lehman DM, Stern MP, Blangero J, Abboud HE, et al. The Ser(326)Cys polymorphism of 8-oxoguanine glycosylase 1 (OGG1) is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Hum Hered.* 2010; 70 (2): 97–101. PMID: 20606456. DOI: 10.1159/000291964.
 24. Daimon M, Oizumi T, Toriyama S, Karasawa S, Jimbu Y, Wada K, et al. Association of the Ser326Cys polymorphism in the OGG1 gene with type 2 DM. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 386 (1): 26–29. PMID: 19486888. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.119.
 25. World Health Organization. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation (WHO/NMH/CHP/CPM/11.1). World Health Organization; 2011.
 26. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006; 22 (15): 1928–9. PMID: 16720584. DOI: 10.1093/bioinformatics/btl268.
 27. Mullins EA, Rodriguez AA, Bradley NP, Eichman BF. Emerging Roles of DNA Glycosylases and the Base Excision Repair Pathway. *Trends Biochem Sci.* 2019; 44 (9): 765–81. PMID: 31078398. DOI: 10.1016/j.tibs.2019.04.006.
 28. Cai H, Wang W, Li M, Jin J, Ge Z. Expression of nucleic acid oxidation metabolites 8-Oxo-GSn and β -amyloid protein in the urine and cerebral tissues of diabetic rats. *Journal of King Saud University — Science.* 2022; 34 (3): 101776. DOI.org/10.1016/j.jksus.2021.101776.
 29. Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia.* 2002; 45 (1): 85–96. PMID: 11845227. DOI: 10.1007/s125-002-8248-z.
 30. Mizukami H, Takahashi K, Inaba W, Tsuboi K, Osonoi S, Yoshida T et al. Involvement of oxidative stress-induced DNA damage, endoplasmic reticulum stress, and autophagy deficits in the decline of β -cell mass in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2014; 37 (7): 1966–74. PMID: 24705612. DOI: 10.2337/dc13-2018.
 31. Ovcherenko SS, Shernyukov AV, Nasonov DM, Endutkin AV, Zharkov DO, Bagryanskaya EG. Dynamics of 8-Oxoguanine in DNA: Decisive Effects of Base Pairing and Nucleotide Context. *J Am Chem Soc.* 2023; 145 (10): 5613–7. PMID: 36867834. DOI: 10.1021/jacs.2c11230.
 32. Whitaker AM, Schaich MA, Smith MR, Flynn TS, Freudenthal BD. Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017; 22 (9): 1493–522. PMID: 28199214. DOI: 10.2741/4555.
 33. Shikazono N, Akamatsu K. Mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) is influenced by nearby clustered lesions. *Mutat Res.* 2018; 810: 6–12. PMID: 29870902. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2018.05.001.
 34. Simone S, Gorin Y, Velagapudi C, Abboud HE, Habib SL. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. *Diabetes.* 2008; 57 (10): 2626–36. PMID: 18599524. DOI: 10.2337/db07-1579.
 35. Manoel-Caetano FS, Xavier DJ, Evangelista AF, Takahashi P, Collares CV, Puthier D, et al. Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. *Gene.* 2012; 511 (2): 151–60. PMID: 23036710. DOI: 10.1016/j.gene.2012.09.090.
 36. Merez A, Markiewicz L, Sliwinska A, Kosmalski M, Kasznicki J, Drzewoski J, et al. Analysis of oxidative DNA damage and its repair in Polish patients with diabetes mellitus type 2: Role in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Adv Med Sci.* 2015; 60 (2): 220–30. PMID: 25932787. DOI: 10.1016/j.advm.2015.04.001.
 37. Hassan FM. OGG1 rs1052133 Polymorphism and Genetic Susceptibility to Chronic Myelogenous Leukaemia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2019; 20 (3): 925–8. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.3.925.
 38. Alanazi M., Pathan AAK, Shaik JP, Alhadheq A, Khan Z, Khan W, et al. The hOGG1 Ser326Cys gene polymorphism and breast cancer risk in Saudi population. *Pathology and Oncology Research.* 2017; 23 (3): 525–35.
 39. Kim KY, Han W, Noh DY, Kang D, Kwack K. Impact of genetic polymorphisms in base excision repair genes on the risk of breast cancer in a Korean population. *Gene.* 2013; 532 (2): 192–6.

- PMID: 24076439. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.069.
40. Osorio A, Milne RL, Kuchenbaecker K, Václavá T, Pita G, Alonso R, et al. DNA glycosylases involved in base excision repair may be associated with cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004256. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004256.
41. Sampath H, Vartanian V, Rollins MR, Sakumi K, Nakabeppu Y, Lloyd RS. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. *PLoS One.* 2012; 7 (12): e51697. PMID: 23284747. DOI: 10.1371/journal.pone.0051697.
42. Gaunt TR, Shihab HA, Hemani G, Min JL, Woodward G, Lyttleton O, et al. Systematic identification of genetic influences on methylation across the human life course. *Genome Biology.* 2016; 17: 61. DOI: 10.1186/s13059-016-0926-z.
43. Sun Z, Zhang Y, Jia J, Fang Y, Tang Y, Wu H, et al. H3K36me3, message from chromatin to DNA damage repair. *Cell Biosci.* 2020; 10: 9. PMID: 32021684. DOI: 10.1186/s13578-020-0374-z.
44. Barash Y, Calarco JA, Gao W, Pan Q, Wang X, Shai O, et al. Deciphering the splicing code. *Nature.* 2010; 465 (7294): 53–59. PMID: 20445623. DOI: 10.1038/nature09000.
45. Luco RF, Pan Q, Tominaga K, Blencowe BJ, Pereira-Smith OM, Misteli T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science.* 2010; 327 (5968): 996–1000. PMID: 20133523. DOI: 10.1126/science.1184208.

ЭКСПРЕССИЯ МТСО1 В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ЛИ ПРИ ДЕЙСТВИИ AAV9-SURF1

М. А. Адрианов^{1,2} ✉, М. С. Готьё¹, А. В. Дегтярева^{1,3}, М. В. Марей¹, Л. А. Манухова¹, С. М. Расторгуев⁴, В. С. Симонов⁴, Л. В. Ушакова¹, М. Ю. Высоких^{1,2}

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

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Клинический институт детского здоровья имени Н. Ф. Филатова, Первый московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Самым частым биохимическим дефектом при синдроме Ли является нарушение белков, которые участвуют в сборке субъединиц IV комплекса электрон-транспортной цепи — цитохром-с-оксидазы (COX). Среди них наиболее часто встречаются мутации гена *SURF1*. Белок SURF1 встроен во внутреннюю мембрану митохондрии и играет решающую роль в сборке COX-комплекса. Все мутации в гене *SURF1* приводят к биосинтезу укороченного белка и повреждениям COX-комплекса. Для терапии данного заболевания исследуют возможность использования аденоассоциированных вирусных векторов (AAV9), в геном которых внесен немутированный *SURF1* (AAV9-SURF1). Целью исследования было дать оценку уровня экспрессии белков SURF1, МТСО1 в цельной крови пациентов с синдромом Ли на фоне полученных референсных значений для пула пациентов без мутаций, а также оценку экспрессии субъединицы цитохром-с-оксидазы МТСО1 в культурах фибробластов кожи пациентов с синдромом Ли при действии AAV9-SURF1. Для моделирования генотерапевтического воздействия к фибробластам, полученным из кожи пациента, и к контрольным фибробластам кожи был добавлен AAV9-SURF1 в подобранной оптимальной дозе, не приводящей к ухудшению жизнеспособности клеток в МТТ-тесте. Методами вестерн-блота и количественной ПЦР мы оценили изменения в относительном количестве исследуемых белков после добавления AAV9-SURF1 на контрольные клетки и клетки, полученные от пациента. Нами были выявлены существенные компенсаторные изменения для фибробластов кожи пациента с мутацией SURF1.

Ключевые слова: синдром Ли, SURF1, аденоассоциированный вирусный вектор, генозаместительная терапия, цитохромоксидаза, COX, МТСО1

Финансирование: исследование выполнено в рамках государственного задания номер ЕГИСУ 125022002694-7 «Разработка генотерапевтических препаратов на основе вирусной доставки для лечения гемофилии, синдрома Ли, гликогеновой болезни Ia типа» на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В. И. Кулакова».

Благодарности: авторы выражают глубокую благодарность А. М. Гамисони и Н. М. Марьчевой за помощь в проведении исследования.

Вклад авторов: М. А. Адрианов — изучение экспрессии генов, подготовка рукописи; М. С. Готьё, А. В. Дегтярева, Л. В. Ушакова — клиническая работа с пациентами; С. М. Расторгуев, В. С. Симонов — конструирование и наращивание ААВ-вектора; М. В. Марей — изучение экспрессии белков, культивация фибробластов, трансфекция, исследование токсичности вирусной конструкции, микроскопия; Л. А. Манухова — пробоподготовка, изучение экспрессии белков, процессинг, статистическая обработка данных; М. Ю. Высоких — общее руководство, координация исследований, написание статьи

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова (протокол № 10 от 28 ноября 2024 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на включение в исследование и использование биологических материалов.

✉ **Для корреспонденции:** Михаил Андреевич Адрианов
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; ya.litsch@gmail.com

Статья получена: 12.12.2025 **Статья принята к печати:** 23.12.2025 **Опубликована онлайн:** 29.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.083

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/>).

EXPRESSION OF MTCO1 IN CELL CULTURES FROM PATIENTS WITH LEIGH SYNDROME UNDER THE ACTION OF AAV9-SURF1

Adrianov MA^{1,2} ✉, Gauthier MS¹, Degtyareva AV^{1,3}, Marey MV¹, Manukhova LA¹, Rastorguev SM⁴, Simonov VS⁴, Ushakova LV¹, Vysokikh MY^{1,2}

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology at Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Filatov Clinical Institute of Child Health, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The most common biochemical defect in Leigh syndrome is aberrations in proteins involved in the assembly of the electron transport chain (ETC) complex IV subunits — cytochrome C oxidase (COX). Among these, mutations in the *SURF1* gene are the most common. The SURF1 protein is embedded in the inner mitochondrial membrane and plays a crucial role in the COX complex assembly. All mutations in the *SURF1* gene result in the truncated protein biosynthesis and damage to the COX complex. Adeno-associated viral vectors (AAV9), which carry the not mutated *SURF1* gene (AAV9-SURF1), are being investigated for the treatment of this disease. The aim of this study was to evaluate the expression levels of SURF1 and MTCO1 proteins in whole blood from patients with Leigh syndrome compared to reference values obtained for a pool of patients without mutations, as well as to evaluate the expression of the MTCO1 cytochrome c oxidase subunit in skin fibroblast cultures from patients with Leigh syndrome treated with AAV9. To investigate the gene therapy efficacy, AAV9-SURF1 was added to fibroblasts derived from the skin of a patient with a mutation in the Surf1 gene and to control skin fibroblasts at an optimal dose that did not impair cell viability in the MTT assay. We used Western blot analysis and quantitative PCR to evaluate changes in the relative amounts of the studied proteins after the addition of AAV9-SURF1 to control cells and cells obtained from the patient and identified significant compensatory changes in skin fibroblasts from a patient with a SURF1 mutation.

Keywords: Leigh syndrome, SURF1, adeno-associated viral vector, gene replacement therapy, cytochrome oxidase, COX, MTCO1

Funding: the study was conducted under state assignment number EGISU 125022002694-7, "Development of gene therapy drugs based on viral delivery for the treatment of hemophilia, Leigh syndrome, and glycogen storage disease type Ia." The project was conducted at the FSBI «National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov», Ministry of Health of the Russian Federation.

Acknowledgements: the authors thank A. M. Gamisoniya and N. M. Marycheva for the help in the research.

Author contribution: Adrianov MA — gene expression assessment, manuscript preparation; Gauthier MS, Degtyareva AV, Ushakova LV — clinical work with patients; Rastorguev SM, Simonov VS — construction and preparation the AAV vector; Marey MV — protein expression assessment, fibroblasts cultivation, transfection, and the viral construct toxicity assessment, microscopy; Manukhova LA — sample processing, protein expression assessment, data processing and statistical analysis; Vysokikh MY — overall supervision, the research coordination, writing the manuscript.

Compliance with ethical standards: all procedures with patients were carried out in accordance with the rules of Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Protocol No. 10, dated November 28, 2024). Voluntary informed consent was obtained from all study participants regarding their inclusion in the study and the use of their biological materials.

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail A. Adrianov
Academica Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia, ya.litsch@gmail.com

Received: 12.12.2025 **Accepted:** 23.12.2025 **Published online:** 29.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.083

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/>).

К митохондриальным энцефаломиопатиям, манифестирующим в раннем возрасте с грубыми прогрессирующими неврологическими нарушениями, относится подострая некротизирующая энцефаломиелопатия, или синдром Ли (Leigh syndrome), описанная профессором Денисом Арчибальдом Ли в 1951 г. в результате посмертного исследования 7-месячного мальчика с прогрессирующими неврологическими симптомами [1].

Синдром Ли представляет собой редкую наследственную патологию — встречаемость составляет ориентировочно один случай на 34–36 тысяч новорожденных, которая в равной степени поражает как мальчиков, так и девочек, представляя собой с точки зрения этиологии генетически чрезвычайно гетерогенное заболевание — его причиной становятся дефекты множества генов, расположенных как на аутосомах и X-хромосоме, так и в митохондриальной ДНК.

Известно, что самым частым биохимическим дефектом при этом синдроме являются нарушения аминокислотной последовательности белков, которые участвуют в сборке субъединиц IV комплекса электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) внутренней мембраны митохондрий — цитохромоксидазы (cytochrome c oxidase, COX), катализирующей перенос электронов в ЭТЦ от цитохрома с к молекулярному кислороду с образованием воды и, таким образом, играющей ключевую роль в митохондриальном окислительном фосфорилировании.

Наиболее часто встречаются мутации в гене белка SURF1 (Sea Urchin Retroposon Family1), встроенного во внутреннюю мембрану митохондрии и играющего решающую роль в сборке COX-комплекса [2]. В норме предшественник SURF1 с молекулярным весом 35 КДа импортируется в митохондрии, где образуется его зрелая форма (30 КДа). При этом практически все мутации (более 60) в гене *SURF1* приводят к биосинтезу белка, укороченного уже на стадии предшественника, и повреждениям COX-комплекса, дестабилизированного дефектным *SURF1*. Около 50% мутаций в гене *SURF1* составляют миссенс-, нонсенс-мутации и небольшие делеции, а наиболее частыми являются делеция 10 нуклеотидов со вставкой двух нуклеотидов (311-321del10insAT) в 4-м экзоне и делеция двух нуклеотидов (845delCT) в 9-м экзоне гена [3, 4].

Установлено, что хотя в большинстве случаев синдром Ли, связанный с SURF1, протекает типично, приводя к ранней смертности до 10 лет, примерно в 10% случаев наблюдается манифестация более мягких симптомов на фоне большей продолжительности жизни [5]. Во всех случаях дебют заболевания приходится на младенческий возраст и характеризуется нарушением питания, связанным с началом поражения центральной нервной системы, гипотонией и плохой координацией сосания и глотания, с последующим дальнейшим регрессом уже состоявшегося психомоторного развития [6]. Как считает ряд исследователей, гастропарез и замедленное опорожнение желудка, а также гастроэзофагеальный рефлюкс при синдроме Ли, обусловленные мутациями в гене *SURF1*, скорее всего, также обусловлены невро-мышечной и митохондриальной дисфункцией, вызванной нарушениями работы ЭТЦ при дефиците цитохромоксидазы [7]. Типичными проявлениями развивающегося заболевания также являются такие нарушения, как нейропатия, атаксия, офтальмоплегия и гипертрихоз [8].

Для исследования молекулярных механизмов и возможности терапии синдрома Ли были созданы мышиные модели, дефицитные по гену *SURF1*($-/-$). Модели

демонстрируют значительное снижение массы тела при рождении, которое выправляется к месяцу жизни, с манифестацией умеренной задержки моторного развития на фоне дефектной сборки и дефицита ряда критических субъединиц COX, включая митохондриально-кодируемую MT-CO1 [9]. Несмотря на описанные нарушения, испытываемые мыши имеют продолжительность жизни, аналогичную дикому типу и было высказано предположение, что потеря такого фактора сборки COX, как Surf1, у мышей приводит к компенсаторным реакциям, включающим активацию митохондриального биогенеза и Nrf2-зависимого сигнального каскада, способствующим купированию проявлений патологического фенотипа [10]. Кроме того, для данной модели было показано, что терапия, проводимая с помощью аденовирусного вектора AAV серотипа 9 (AAV9) для лечения синдрома Ли, связанного с SURF1, при которой мышам вводили кодон-оптимизированный ген человеческого SURF1 (hSURF1opt) (AAV9/hSURF1v1) приводит к восстановлению не только функции SURF1, но и активности комплекса IV, а также коррекции вызванного физической нагрузкой лактатного ацидоза без признаков токсичности для мышей дикого типа [11, 12].

В данной работе мы использовали сходный подход с целью изучения возможностей генотерапии синдрома Ли на модели подкожных фибробластов пациентов с мутацией в гене *SURF1* при трансфекции аденовирусной конструкцией с кодон-оптимизированным геном человеческого SURF1.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены три пациента с генетически подтвержденным диагнозом синдром Ли и типичными для заболевания клиническими проявлениями. Критерии включения в исследование: генетически подтвержденный диагноз синдрома Ли с часто встречающимися мутациями в гене *SURF1* (табл. 1); возраст манифестации заболевания — до 3 лет; наличие информированного согласия законного представителя пациента. Критерии исключения: наличие другого генетически обусловленного заболевания, в том числе синдромальной формы патологии. Два пациента рождены доношенными, в удовлетворительном состоянии при рождении (оценка по Апгар 8/9 баллов), с нормальными к сроку гестации массой тела и длиной, один пациент рожден на сроке 30 недель. У всех пациентов с первых месяцев жизни отмечалось отставание в психомоторном развитии. В динамике состояние пациентов прогрессивно ухудшалось, отмечалась утрата моторных и психоречевых навыков, у первых двух пациентов имели место метаболические кризы — ацетонемическое состояние в виде рвот, отказа от еды, слабости, вялости. Тяжелые бульбарные нарушения привели к необходимости установки гастростомы первому и второму пациентам, трахеостомы третьему пациенту и необходимости в респираторной поддержке у первого (НИВЛ). Всем пациентам диагноз установлен в возрасте старше 1,5 лет. По данным МРТ выявлены характерные для заболевания изменения вещества головного мозга: у первого пациента в возрасте 2 лет МР-признаки билатеральных симметричных структурных изменений черной субстанции, красных ядер, по ходу проводящих путей в продолговатом мозге и в средних ножках мозжечка, у второго пациента (1 год 4 месяца) отмечалось двустороннее симметричное повышение интенсивности

Таблица 1. Клинико-anamnestические данные пациентов, включенных в исследование

Пол		Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3
		Девочка	Девочка	Мальчик
Вариант в гене <i>SURF1</i>		Делеции в гетерозиготном состоянии: c.845_84delCT; p.(Ser282Cysfs*9) c.901_902delTC; p.(Ter301Thrext27)	Варианты в компаунд-гетерозиготном состоянии: c.845_846delCT c.752-2A>G	Варианты в компаунд-гетерозиготном состоянии: c.240G>C(p.Q80H) c.870dupT(p.K29I)
Возраст манифестации		1 месяц задержка психомоторного развития	1 год метаболический криз	2 года тремор рук, нарушение походки, моторная неловкость
Возраст на момент диагностики заболевания		2,5 года	1,5 года	2,5 года
Возраст на момент исследования		6 лет	5,5 лет	12 лет
Клинические проявления на момент исследования	Задержка психомоторного развития	+	+	+
	Бульбарные нарушения	+ гастростома	+ гастростома	+ трахеостома
	Полинейропатический синдром	+	+	+
	Метаболические кризы	+	+	+
	Респираторная терапия	НИВЛ 10 ч в сутки	-	-
	Палиативный статус	+	+	+

сигнала базальных ядер, кортико-спинальных трактов и стволовых структур, у третьего пациента (1 год 2 месяца) имело место повышение интенсивности сигнала нижних отделов ствола головного мозга (мост, продолговатый мозг) без вовлечения базальных ганглиев. Диагноз подтвержден молекулярно-генетическими методами исследования (табл. 1).

На момент исследования в неврологическом статусе у всех пациентов отмечалось нарушение координации и фиксации зрения, ротаторный нистагм с вертикальным компонентом, плавающие движения глазных яблок, бульбарно-псевдобульбарный синдром, диффузная общая туловищная и конечностная гипотония/атония на фоне смешанного тетрапареза, снижение сухожильно-периостальных рефлексов, полинейропатический синдром с дистальной гипотрофией мышц конечностей, миогенные контрактуры в крупных суставах.

Группа контроля была набрана среди здоровых детей (3–13 лет) с невыявленными мутациями в гене *SURF1* и с отсутствием какой-либо симптоматики, обращавшихся в детское поликлиническое отделение НЦАГиП им. В. И. Кулакова в рамках планового обследования педиатром.

Получение образцов крови

Цельную кровь, обработанную ЭДТА, в течение 15–60 мин после внутривенного забора у пациентов обрабатывали лизирующим буфером на основе хлорида аммония и калия (AbiLyse ACK Lysing Buffer, США) по методике, описанной производителем с целью последующего получения проб для вестерн-блот-анализа.

Культивирование фибробластов

Первичные клеточные культуры подкожных фибробластов были любезно предоставлены из коллекции РНИМУ им. Пирогова и с третьего пассажа клетки культивировали на полной питательной среде следующего состава: DMEM («ПанЭко», Россия): F12 («ПанЭко», Россия), в соотношении 1 : 1, с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (PenStrep, GIBCO, США) и

10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, GIBCO, США) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. По достижении 60% конфлюэнтности, клетки пересевали в соотношении 1/3 с помощью 0,05% трипсина /ЭДТА («ПанЭко», Россия) на культуральные флаконы. Активность трипсина подавляли добавлением соответствующего количества свежей питательной среды. На каждом пассаже количество клеток определяли с помощью камеры Горяева («МИНИМЕД», Россия). Морфологию клеток оценивали с помощью светового инвертированного микроскопа NIKON ECLIPSE TS100 (JAPAN).

Получение генетической конструкции в AAV-векторе, несущей ген *SURF1*

Для выделения тотальной РНК использовали коммерческий набор RNA-solo («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы ткани гомогенизировали и лизировали реагентом ExtractRNA («Евроген», Россия) с последующей экстракцией и очисткой РНК. Концентрацию и чистоту полученной РНК оценивали спектрофотометрически, проверку целостности РНК и отсутствия деградации проводили методом электрофореза в 2%-м агарозном геле. Визуализацию результатов осуществляли с использованием геля-документирующей системы GenoSens 2250 Touch (Clinx). Синтез первой цепи кДНК проводили на матрице выделенной РНК с использованием набора реагентов на основе обратной транскриптазы Magnus («Евроген», Россия).

Для амплификации полной кодирующей последовательности гена *SURF1* были разработаны специфические праймеры, содержащие на 5'-концах дополнительные нуклеотидные последовательности, комплементарные концевым участкам линейаризованной плазмиды rAAV-CAG, для последующей сборки методом TLTC. Праймеры имели следующую структуру. Прямой праймер SURF1-dir: 5'-tgtccaggcgccgccATGGCGGCG GTGGCT-3' и обратный праймер SURF1-rev: 5'-aggcacagt cgaggcagatctTCACACACCAGGTGTCCCAC-3' (строчные буквы — гомологичные вектору последовательности, а

прописные — участки, комплементарные началу и концу открытой рамки считывания гена *SURF1*). Температура отжига праймеров и специфичность были рассчитаны с помощью программы Primer3. Амплификацию гена *SURF1* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Протокол амплификации включал начальную денатурацию при 95 °C 5 мин, 30 циклов (денатурация при 95 °C — 30 с, отжиг при 62 °C — 30 с, элонгация при 72 °C — 1 мин) и финальную элонгацию при 72 °C 5 мин. Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 1%-м агарозном геле.

Плазмидный вектор pAAV-CAG подготавливали для клонирования с помощью ПЦР-амплификации с праймерами Vec-dir (AGATCTGCCTCGACTGTGCCT) и Vec-rev (GGCGGCCCGCTGGACA) и полимеразой Kara (Roche), что обеспечивало получение линейной молекулы с концевыми последовательностями, гомологичными амплифицированному гену *SURF1*. Сборку рекомбинантной плазмиды осуществляли методом T5 экзонуклеазно-зависимой сборки, смешивая очищенный ПЦР-продукт гена *SURF1* и линейаризованный вектор с добавлением T5 экзонуклеазы и инкубируя смесь на льду 5 мин. Два микролитра реакционной смеси использовали для трансформации химически компетентных клеток *E. coli* штамма XL-Blue («Евроген», Россия) по стандартной методике [13].

Плазмидную ДНК выделяли из культур мини-препаративным методом с набором Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген», Россия). Первичный скрининг положительных клонов проводили с помощью ПЦР со специфичными для *SURF1* праймерами. Корректность полученной рекомбинантной конструкции дополнительно подтверждали рестрикционным анализом эндонуклеазой PstI в буфере Orange («Сибэнзим», Россия) с последующим анализом профиля рестрикции методом электрофореза в агарозном геле.

Оценка цитотоксического действия вируса

Цитотоксическое действие вируса оценивали с помощью МТТ-теста жизнеспособности клеток кожи пациентов без мутации *Surf1*. Клеточную культуру четвертого пассажа высевали в 96-луночные прозрачные плоскодонные планшеты (Greiner Bio-One, Австрия) в концентрации 1×10^5 кл./лунка. Через 24 ч культивирования при 37 °C и 5% CO₂ клетки обрабатывали различными концентрациями вируса — 10^{13} , 10^{12} , 10^{10} , 10^8 вирусных частиц на 1 мл культуральной среды. В контрольные лунки вместо вирусных частиц вносили среду культивирования в адекватных количествах. После добавления вирусных частиц клетки инкубировали 24 ч при вышеописанных условиях и по окончании инкубации в каждую лунку микропланшета добавляли по 20 мкл раствора, содержащего 4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ, Santa Cruz) в концентрации 5 мг/мл. Через 4 ч

среду с реагентом МТТ удаляли и для солюбилизации кристаллов формазана в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного ридера ELISA при 570 нм. Анализ проводили трижды для расчета среднего значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) и стандартного отклонения.

Электрофорез и вестерн-блот-анализ содержания целевых белков в лизатах клеток цельной крови и фибробластов

Для анализа относительного содержания исследуемых белков в лизатах клеток цельной крови и фибробластов кожи с/без заражения вирусной конструкцией образцы разделяли методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле с последующим электропереносом на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) [15]. Мембраны инкубировали со специфичными первичными антителами (anti-Surf1 (Abcam; ab110256, 1:1000), anti-MTCO1 (Abcam; ab14705, 1:1000) с последующей инкубацией со вторичными антивидовыми HRP-связанными антителами. Сигналы анализировали с помощью реакции усиленной хемилюминесценции с использованием набора Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit (INVITROGEN, США) в соответствии с инструкциями производителя. Нормализовали сигнал от белков интереса на содержание общего белка, определенное по интенсивности окрашивания при помощи красителя Понсо (0,5% в 1%-й уксусной кислоте).

Оценка уровня экспрессии целевых генов в лизатах фибробластов после трансфекции

Экспрессию генов оценивали методом обратной транскрипции (ОТ) в реальном времени с использованием ПЦР с применением специфических для транскриптов праймеров (табл. 1). Выделение и анализ чистоты РНК проводили, как описано выше. Для проведения ОТ к 0,5 мкг тотальной РНК добавляли 2 мкл 20 мкМ случайного гексапраймера и инкубировали 2 мин при 70 °C. Затем пробирку переносили в лед, добавляли 4 мкл 5х ОТ-буфера, 2 мкл 10 мМ смеси dNTP, 2 мкл 20 мМ DTT, 1 мкл обратной транскриптазы MMLV (50 ед/мкл) («Евроген», Россия). Смесь инкубировали 40 мин при 40 °C и останавливали реакцию прогреванием в течение 10 мин при 70 °C. Последующую ПЦР в реальном времени проводили по схеме: 50 нг кДНК матрицы, по 0,4 мкл прямого и обратного праймера (100 пмоль), 2 мкл 5хqPCRmixHS SYBR. Контроль амплификации проводили с помощью электрофореза в 3%-м агарозном геле. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы QGENE (2-ΔCt метод). Нормировку экспрессии каждого целевого гена проводили на ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). В ходе работы были

Таблица 2. Характеристика праймеров

Ген	Направление праймера	Последовательность праймера с 5'→3'	Длина праймера, п.н.	Длина продукта, п.н.	Температура отжига, °C
GAPDH	Прямой	GGATTTGGTCGATTTGGG	18	205	55,5
	Обратный	GGAAGATGGTGATGGGATT	19		
SURF1	Прямой	GCGGCCTCATCTCCT	15	281	58,6
	Обратный	CTCTGCGCCTGTGATTC	17		
MTCO1	Прямой	CCTACTCCTGCTCGCATCTG	20	363	59,4
	Обратный	AGAATGGGGTCTCCTCCTCC	20		

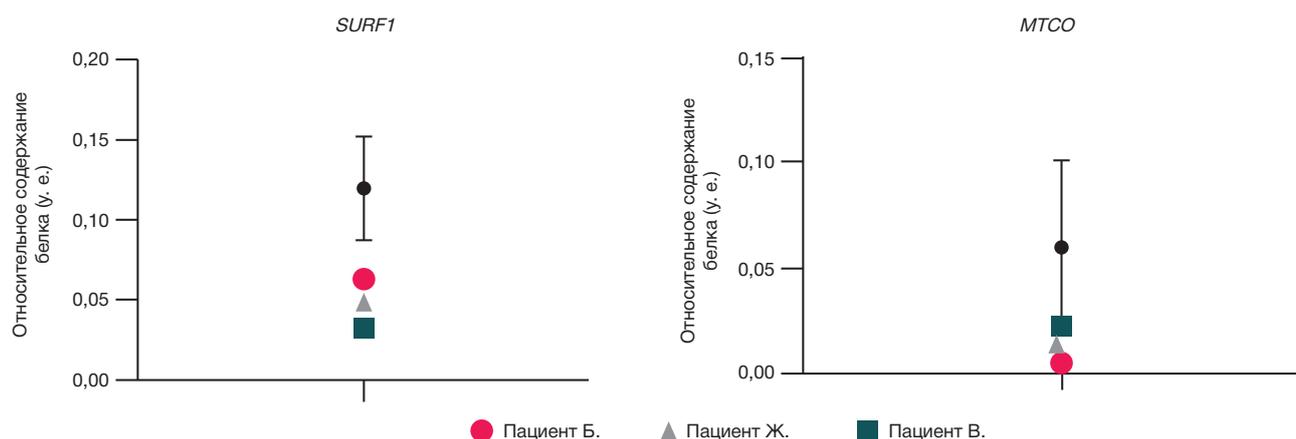


Рис. 1. Относительное содержание белков в клетках цельной крови, полученное для выборки ($n = 20$, черные кружки) здоровых пациентов (3–11 лет) и пациентов с мутацией в гене *SURF1* (цветные символы), представлено как среднее арифметическое с 95% процентилем в отклонениях

подобраны праймеры, специфичные к транскриптам соответствующих генов (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Относительное содержание белков SURF1 и MTCO1 в клетках венозной крови 20 пациентов детского возраста (3–11 лет) без митохондриальных патологий (группа «контроль») было определено при помощи вестерн-блот-анализа, данные для референсных значений представлены на рис. 1. Показано, что относительное содержание исследуемых белков снижено у пациентов с мутациями в гене *SURF1* по сравнению с контрольной группой.

Для определения безопасности генотерапевтического воздействия по результатам исследования зависимости жизнеспособности клеток от количества внесенных вирусных частиц было рассчитано, что доза в 104 на клетку является оптимальной (рис. 2). Далее к фибробластам, полученным из кожи пациента с мутацией в гене *SURF1*, и к контрольным фибробластам был добавлен аденовирусный конструкт с нормальным аналогом гена *SURF1* в подобранной оптимальной дозе, не приводящей к ухудшению жизнеспособности клеток в МТТ-тесте.

Экспрессию генов *SURF1* и *MTCO1* в лизатах фибробластов после заражения клеток AAV9-SURF1 оценивали при помощи количественной ПЦР. Во-первых, нами было выявлено, что в фибробластах, полученных от пациентов без мутаций в гене *SURF1* значительно выше уровень экспрессии этого гена по сравнению с фибробластами больных с синдромом Ли и мутациями в гене *SURF1* (рис. 3, левая панель). При этом оказалось, что уровень экспрессии гена *MTCO1* достоверно не отличается от такового для фибробластов больных и участников контрольной группы (рис. 3, правая панель). Во-вторых, уровень экспрессии гена *SURF1* достоверно растет в фибробластах от пациентов с мутациями и достоверно не отличается от уровня экспрессии этого гена под действием генотерапевтического конструкта в контрольных фибробластах. Аналогичную картину мы наблюдали для гена *MTCO1* — достоверный рост под действием трансфекции в больных фибробластах по сравнению с уровнем до трансфекции. Любопытно, что уровень экспрессии гена *MTCO1* после трансфекции кратно выше исходного как для больных, так и для здоровых клеток (рис. 3).

При анализе содержания целевых белков после воздействия генотерапевтического конструкта нами были

выявлены существенные различия между контрольными клетками и подкожными фибробластами пациента с мутацией *SURF1*. Методом вестерн-блот-анализа мы оценили изменения в относительном количестве исследуемых белков и показали, что через 24 ч после внесения вируса в культуральную среду как для клеток дикого типа, так и для мутантов по гену *SURF1* наблюдается достоверное увеличение уровня белка ($p < 0,05$), но для фибробластов от пациентов с мутацией это увеличение более выражено (рис. 4, левая панель). Показано также, что исходный уровень белка SURF1 в клетках дикого типа значительно выше, чем в мутантных клетках. Что касается белка MTCO1, исходно значительно более представленного в клетках дикого типа, увеличения его экспрессии под действием вируса не наблюдается в контрольных фибробластах, в то время как для клеток пациентов с мутацией SURF1 уровень MTCO1 достоверно возрастал через 24 ч после добавления вируса к клеткам (рис. 4, правая панель) и даже превышает уровень белка в клетках дикого типа ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках общепринятой концепции о том, что белок SURF1 играет критическую роль в сборке голофермента цитохромоксидазы (ЦО), с механистической точки зрения, можно предположить, что потеря белка SURF1 влияет на активность ЦО посредством стабилизации структуры мультибелкового комплекса в митохондриальной

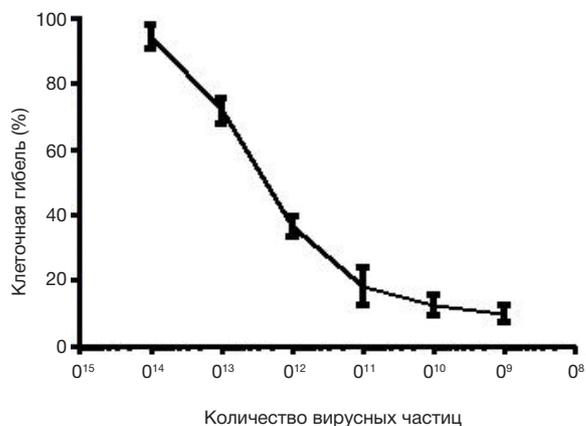


Рис. 2. Цитотоксическое действие вируса на контрольные фибробласты. Анализ проводили трижды для расчета среднего значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) и стандартного отклонения

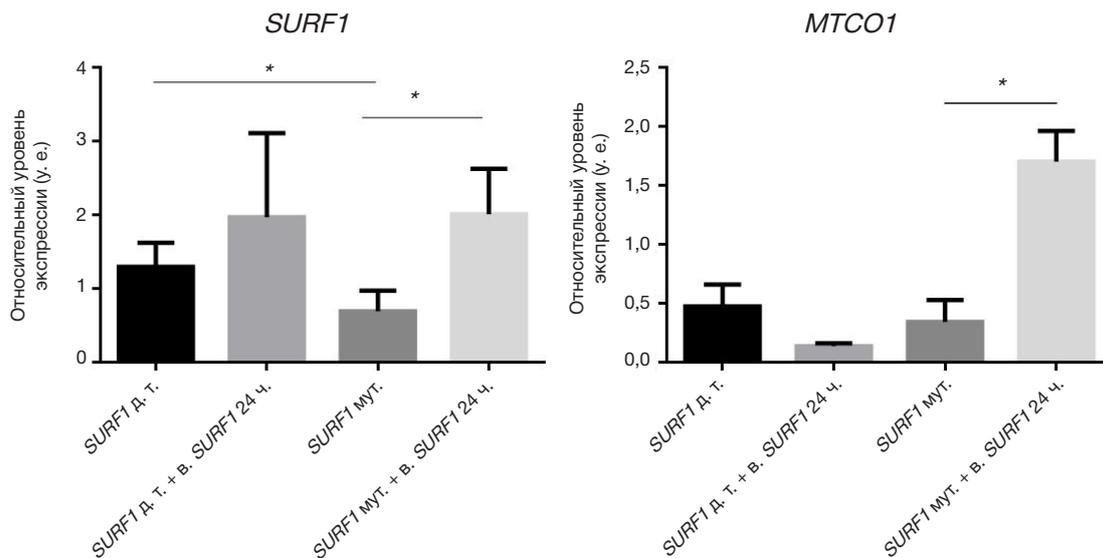


Рис. 3. Экспрессия генов *SURF1* и *MTCO1* в лизатах подкожных фибробластов пациентов без мутации *SURF1* (д. т. — дикий тип на графиках) и с мутацией в гене *SURF1* (*SURF1* мут.) через 24 ч после заражения AAV9-SURF1. * — $p < 0,05$ (Манн-Уитни).

мембране [15]. При манифестации синдрома Ли у пациентов с мутациями в гене *SURF1* обычно сохраняется не более 20% активности ЦО, в то время как для модельных животных с нокаутом по этому гену остается не менее 50% активности фермента, что и приводит к такой значительной (до 30%) разнице между фенотипами пациентов с синдромом Ли и мышами с дефицитом белка SURF1 [12]. Однако, хотя использование таких моделей не кажется перспективным ввиду наблюдающихся фенотипических различий, применение генотерапии при помощи вектора на базе AAV9-SURF1 все же привело к значительному росту активности цитохромоксидазы в головном мозге, мышцах и печени SURF1-дефицитных мышей [12], что дает основания предполагать возможность увеличения активности этого фермента и улучшения состояния у пациентов с синдромом Ли, обусловленным аналогичными мутациями в гене *SURF1*.

В нашей модели, где сравнивали эффект трансфекции при помощи AAV9-SURF1 фибробластов пациентов с клинически выставленным синдромом Ли и фибробластов здоровых детей, мы ставили задачу определить уровень экспрессии не только белка SURF1, но и MT-CO1, который обычно используют в качестве маркера уровня содержания и нативной структуры всей цитохромоксидазы. В нашей работе мы наблюдали синхронный подъем уровня экспрессии как генов, так и белков SURF1 и MT-CO1 в фибробластах больных. Ранее наблюдавшиеся исследователями тенденции улучшения состояния модельных животных при аналогичных изменениях в ответ на генотерапию позволяют предположить возможность увеличения активности цитохромоксидазы в клеточных моделях. Измерение активности этого фермента в ответ на трансфекцию клеток первичных культур пациентов с синдромом Ли представляется важным этапом

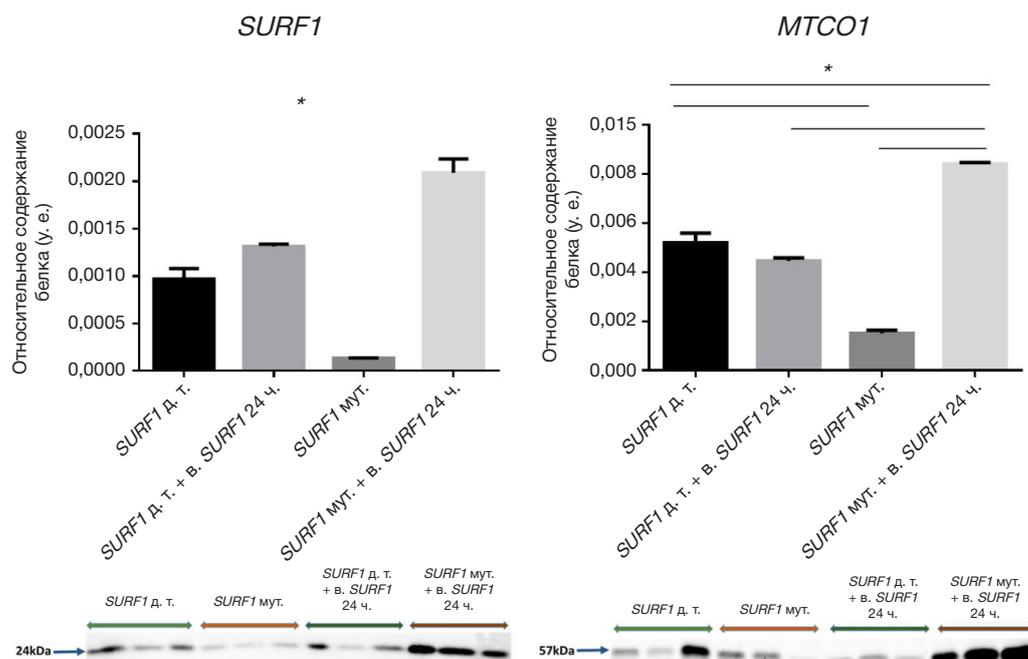


Рис. 4. Относительное содержание белков SURF1 и MTCO1 в лизатах подкожных фибробластов пациентов без мутации *SURF1* (д. т. — дикий тип на графиках) и с мутацией в гене *SURF1* (*SURF1* мут.) через 24 ч после заражения AAV9-SURF1 (верхняя панель). * — $p < 0,05$ (Манн-Уитни). На нижней панели представлены репрезентативные электрофорезграммы, иллюстрирующие изменения содержания целевых белков при действии вирусной конструкции

доклинических исследований предлагаемого препарата на базе аденовирусной конструкции. Предложенный подход исследования эффективности генотерапии на клетках пациентов лишен недостатков мышинной модели, где для выявления эффекта, по мнению исследователей, необходимо создание более тяжелого фенотипа ввиду отсутствия поведенческих дефектов и нейромоторных нарушений. Ранее было показано, что у имеющих модельных животных манифестация заболевания в легкой форме обусловлена активацией компенсаторных механизмов у выживших особей при естественной селекции, в отличие от человека, где врачебная помощь

приводит к выживанию даже при манифестации тяжелой формы заболевания [10].

ВЫВОДЫ

Полученная конструкция AAV9-hSURF1 позволяет осуществить безопасную трансфекцию в дозе, уже через 24 ч приводящую к возможности регистрации достоверного кратного увеличения экспрессии как генов, так и белков SURF1 и MTCO1 в клетках пациентов с синдромом Ли с исходно низким содержанием этих белков по сравнению с клетками здоровых людей.

Литература

1. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1951; 14 (3): 216–21. DOI: 10.1136/jnnp.14.3.216
2. Freya A Bundschuh 1, Achim Hannappel, Oliver Anderka, Bernd Ludwig. Surf1, associated with Leigh syndrome in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis. *J Biol Chem*. 2009; 284 (38): 25735–41. DOI: 10.1074/jbc.M109.040295.
3. Valeria Tiranti, Konstanze Hoertnagel, Rosalba Carrozzo, Claudia Galimberti, Monica Munaro, Matteo Granatiero et al. Mutations of SURF-1 in Leigh Disease Associated with Cytochrome c Oxidase Deficiency. 1998; 63: 1609–21.
4. Zhiqing Zhu, Jianbo Yao, Timothy Johns, Katherine Fu, Isabelle De Bie, Carol Macmillan, et al. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nature Genetics*. 1998; 20: 337–43.
5. Inn-Chi Lee, Kuo-Liang Chiang. Clinical Diagnosis and Treatment of Leigh Syndrome Based on SURF1: Genotype and Phenotype Antioxidants. 2021; 10 (12): 1950. Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox10121950>.
6. Shamima Rahman. Gastrointestinal and hepatic manifestations of mitochondrial disorders. SSIEM Symposium. 2012; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9614-2>
7. Albert Z Lim, Yi Shiao Ng, Alasdair Blain, Cecilia Jiminez-Moreno, Charlotte L Alston, Victoria Nesbitt, et al. Natural History of Leigh Syndrome: A Study of Disease Burden and Progression. *Ann Neurol*. 2022; 91 (1): 117–30. DOI: 10.1002/ana.26260. Epub 2021 Nov 12.
8. Yehani Wedatilake, Ruth M Brown, Robert McFarland, Joy Yaplito-Lee, Andrew A M Morris, Mike Champion, et al. SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2013; 8 (96).
9. Andrzej Bartke. New findings in gene knockout, mutant and transgenic mice. *Exp Gerontol*. 2008; 43 (1): 11–4. DOI: 10.1016/j.exger.2007.10.009.
10. Daniel A Pulliam, Sathyaseelan S Deepa, Yuhong Liu, Shauna Hill, Ai-Ling Lin, Arunabh Bhattacharya, et al. Complex IV-deficient Surf1(–/–) mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochem J*. 2014; 462 (2): 359–71. DOI: 10.1042/BJ20140291.
11. Qinglan Ling, Matthew Rioux, Harrison Higgs, Yuhui Hu, Scarlett E. Dwyer, Steven J. Gray Improved AAV9-based gene therapy design for SURF1-related Leigh syndrome with minimal toxicity. *Molecular therapy*. 2025; 33 (3): 101554.
12. Qinglan Ling, Matthew Rioux, Yuhui Hu, MinJae Lee, Steven J Gray. Adeno-associated viral vector serotype 9-based gene replacement therapy for SURF1-related Leigh syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021; 23: 158–68. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.09.001.
13. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*. 1991; 204 (C): 63–113.
14. Khashchenko EP, Vysokikh MYu, Marey MV, Sidorova KO, Manukhova LA, Shkavro NN, et al. Altered Glycolysis, Mitochondrial Biogenesis, Autophagy and Apoptosis in Peritoneal Endometriosis in Adolescents. *Int J Mol Sci*. 2024; 25: 4238. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms25084238>.
15. Giuseppe Magro, Vincenzo Laterza, Federico Tosto. Leigh Syndrome: A Comprehensive Review of the Disease and Present and Future Treatments *Biomedicines*. 2025, 13 (3): 733. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030733>.

References

1. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1951; 14 (3): 216–21. DOI: 10.1136/jnnp.14.3.216
2. Freya A Bundschuh 1, Achim Hannappel, Oliver Anderka, Bernd Ludwig. Surf1, associated with Leigh syndrome in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis. *J Biol Chem*. 2009; 284 (38): 25735–41. DOI: 10.1074/jbc.M109.040295.
3. Valeria Tiranti, Konstanze Hoertnagel, Rosalba Carrozzo, Claudia Galimberti, Monica Munaro, Matteo Granatiero et al. Mutations of SURF-1 in Leigh Disease Associated with Cytochrome c Oxidase Deficiency. 1998; 63: 1609–21.
4. Zhiqing Zhu, Jianbo Yao, Timothy Johns, Katherine Fu, Isabelle De Bie, Carol Macmillan, et al. SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nature Genetics*. 1998; 20: 337–43.
5. Inn-Chi Lee, Kuo-Liang Chiang. Clinical Diagnosis and Treatment of Leigh Syndrome Based on SURF1: Genotype and Phenotype Antioxidants. 2021; 10 (12): 1950. Available from: <https://doi.org/10.3390/antiox10121950>.
6. Shamima Rahman. Gastrointestinal and hepatic manifestations of mitochondrial disorders. SSIEM Symposium. 2012; Available from: <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9614-2>
7. Albert Z Lim, Yi Shiao Ng, Alasdair Blain, Cecilia Jiminez-Moreno, Charlotte L Alston, Victoria Nesbitt, et al. Natural History of Leigh Syndrome: A Study of Disease Burden and Progression. *Ann Neurol*. 2022; 91 (1): 117–30. DOI: 10.1002/ana.26260. Epub 2021 Nov 12.
8. Yehani Wedatilake, Ruth M Brown, Robert McFarland, Joy Yaplito-Lee, Andrew A M Morris, Mike Champion, et al. SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2013; 8 (96).
9. Andrzej Bartke. New findings in gene knockout, mutant and transgenic mice. *Exp Gerontol*. 2008; 43 (1): 11–4. DOI: 10.1016/j.exger.2007.10.009.
10. Daniel A Pulliam, Sathyaseelan S Deepa, Yuhong Liu, Shauna Hill, Ai-Ling Lin, Arunabh Bhattacharya, et al. Complex IV-deficient Surf1(–/–) mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochem J*. 2014; 462 (2): 359–71. DOI: 10.1042/BJ20140291.

11. Qinglan Ling, Matthew Rioux, Harrison Higgs, Yuhui Hu, Scarlett E. Dwyer, Steven J. Gray Improved AAV9-based gene therapy design for SURF1-related Leigh syndrome with minimal toxicity. *Molecular therapy*. 2025; 33 (3): 101554.
12. Qinglan Ling, Matthew Rioux, Yuhui Hu, MinJae Lee, Steven J Gray. Adeno-associated viral vector serotype 9-based gene replacement therapy for SURF1-related Leigh syndrome. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021; 23: 158–68. DOI: 10.1016/j.omtm.2021.09.001.
13. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*. 1991; 204 (C): 63–113.
14. Khashchenko EP, Vysokikh MYu, Marey MV, Sidorova KO, Manukhova LA, Shkavro NN, et al. Altered Glycolysis, Mitochondrial Biogenesis, Autophagy and Apoptosis in Peritoneal Endometriosis in Adolescents. *Int J Mol Sci*. 2024; 25: 4238. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms25084238>.
15. Giuseppe Magro, Vincenzo Laterza, Federico Tosto. Leigh Syndrome: A Comprehensive Review of the Disease and Present and Future Treatments *Biomedicines*. 2025, 13 (3): 733. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines13030733>.

УРОГЕНИТАЛЬНЫЕ ЗОНДЫ ТИПА ПАЙПЕЛЬ-С НЕ ПРЕДОТВРАЩАЮТ КОНТАМИНАЦИЮ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ ОБРАЗЦОВ ЦЕРВИКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТОЙ

Д. Л. Зорников¹✉, А. А. Бехтер¹, Д. О. Корнилов¹, В. М. Симарзина¹, Д. М. Нечаева¹, А. Е. Карякина¹, М. А. Лешукова¹, П. Г. Аминова^{1,3}, Е. С. Ворошилина^{1,2}

¹ Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

³ ООО «Кволити Мед», Екатеринбург, Россия

Существенным методологическим ограничением в изучении микробиома эндометрия выступает риск контаминации проб цервикальной микробиотой в ходе трансцервикального взятия материала. Целью работы было экспериментально оценить эффективность урогенитальных зондов типов Пайпель-С1 (Пайпель-биопсия) и Пайпель-С2 (Эндобраш) в предотвращении данного вида контаминации. Для этого была разработана *in vitro* модель шейки матки двух типов (с цилиндрическим и щелевидным каналом), заполненная модельной цервикальной слизью с известным количеством бактериальной ДНК. После прохождения зондами через модельный цервикальный канал выполняли забор «эндометриальной» пробы (стерильный воздух) с последующим количественным ПЦР-анализом. Оба типа зондов продемонстрировали значительный перенос бактериальной ДНК из цервикальной слизи в эндометриальную пробу. Медианный перенос общей бактериальной ДНК составил 81,6% [54,4–107] для Пайпель-С1 и 29,8% [14,8–56,3] для Пайпель-С2 ($p = 0,009$). Ни один из зондов не обеспечивал защиты от контаминации на уровне, позволяющем достоверно интерпретировать состав микробиоты эндометрия. Эффективность зондов в предотвращении контаминации зависела от анатомической формы канала и конкретной группы микроорганизмов. Полученные результаты свидетельствуют, что ни один из исследованных зондов не обеспечивает надежной защиты от контаминации, что затрудняет интерпретацию данных о составе микробиоты эндометрия в трансцервикально полученных образцах и указывает на целесообразность изучения совокупной цервико-эндометриальной микробиоты.

Ключевые слова: микробиота эндометрия, цервикальный канал, контаминация, зонд Пайпель, ПЦР в реальном времени, молекулярная диагностика

Вклад авторов: Д. Л. Зорников — организация исследования, анализ данных, статистический анализ, написание и редактирование статьи; А. А. Бехтер — разработка и изготовление *in vitro* моделей шейки матки; Д. О. Корнилов — разработка и изготовление *in vitro* моделей шейки матки, подготовка иллюстраций; В. М. Симарзина — проведение экспериментальных работ (взятие проб на моделях), подготовка рукописи; Д. М. Нечаева — проведение экспериментальных работ (взятие проб на моделях), проведение молекулярно-генетических исследований (ПЦР), подготовка рукописи; А. Е. Карякина — проведение молекулярно-генетических исследований (ПЦР), подготовка рукописи и иллюстраций; М. А. Лешукова — подготовка рукописи; П. Г. Аминова — подготовка и предоставление бактериальных культур для анализа; Е. С. Ворошилина — научное руководство и координация, анализ и интерпретация данных, написание и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России (протокол № 3 от 20 июня 2025 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Данила Леонидович Зорников
ул. Ключевская, д. 17, г. Екатеринбург, 620109, Россия; zornikovdl@yandex.ru

Статья получена: 18.11.2025 **Статья принята к печати:** 05.12.2025 **Опубликована онлайн:** 13.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.073

PIPELLE AND ENDOBRUSH CATHETERS DO NOT PREVENT CONTAMINATION OF ENDOMETRIAL SAMPLES BY CERVICAL MICROBIOTA

Zornikov DL¹✉, Bekhter AA¹, Kornilov DO¹, Simarzina VM¹, Nechaeva DM¹, Karyakina AE¹, Leshukova MA¹, Amineva PG^{1,3}, Voroshilina ES^{1,2}

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

³ LLC "Quality Med", Yekaterinburg, Russia

The risk of contamination by cervical microbiota during transcervical sampling represents a fundamental methodological challenge in endometrial microbiome research. This study aimed to experimentally evaluate the efficacy of Pipelle and Endobrush endometrial sampling catheters in preventing this contamination. An *in vitro* cervix model with two anatomically distinct canal types (cylindrical and slit-like) was developed and filled with a synthetic cervical mucus containing a defined quantity of bacterial DNA. After catheter passage through the model cervical canal, a simulated 'endometrial' sample (sterile air) was collected and subjected to quantitative PCR analysis. Both catheter types facilitated substantial transfer of bacterial DNA from the cervical mucus into the endometrial sample. The median transfer of total bacterial DNA was 81.6% [54.4–107] for the Pipelle catheter and 29.8% [14.8–56.3] for the Endobrush catheter ($p = 0.009$), indicating that neither device provided sufficient protection for reliable characterization of the endometrial microbiota. Catheter efficacy was further dependent on cervical canal morphology and the specific microbial group analyzed. These findings demonstrate that transcervical sampling with either catheter type introduces a significant and variable degree of cervical contamination, thereby confounding the interpretation of endometrial microbiota data and underscoring the need to conceptualize and study a combined cervico-endometrial microbiota.

Keywords: endometrial microbiota, cervical canal, contamination, Pipelle catheter, Endobrush catheter, real-time PCR, molecular diagnostics

Author contribution: Zornikov DL — study organization, data analysis, statistical analysis, writing and editing of the article; Bekhter AA — development and creation of *in vitro* cervical models; Kornilov DO — development and creation of *in vitro* cervical models, preparation of illustrations; Simarzina VM — execution of experimental work (sampling from models), manuscript preparation; Nechaeva DM — execution of experimental work (sampling from models), performance of molecular genetic studies (PCR), manuscript preparation; Karyakina AE — performance of molecular genetic studies (PCR), preparation of the manuscript and illustrations; Leshukova MA — manuscript preparation; Amineva PG — preparation and provision of bacterial cultures for analysis; Voroshilina ES — scientific supervision and coordination, analysis and interpretation of data, writing and editing of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University (Protocol № 3 dated June 20, 2025).

✉ **Correspondence should be addressed:** Danila L. Zornikov
Kluchevskaya, 17, Yekaterinburg, Russia, 620109; zornikovdl@gmail.com

Received: 18.11.2025 **Accepted:** 05.12.2025 **Published online:** 13.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.073

С тех пор как молекулярно-генетическими методами в полости матки обнаружена резидентная микробиота [1], исследование микробиоты эндометрия является одним из приоритетных направлений в области микробиома человека [2, 3]. При этом вышеуказанное, основополагающее исследование Mitchell с соавторами [1] было выполнено на матках после гистерэктомии, что гарантирует отсутствие контаминации вагинальной и цервикальной микробиотой и подтверждает наличие резидентных микроорганизмов именно в эндометрии. В последующих аналогичных исследованиях на экстирпированных матках было показано, что общее количество бактериальной ДНК в эндометрии примерно в 10 раз ниже [4] или сопоставимо с таковым в цервикальной слизи [5].

Очевидно, что в реальной клинической практике в исследованиях микробиома эндометрия практически всегда используют трансцервикальное взятие образцов из полости матки: катетером для интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов или переноса эмбрионов [6, 7], гистероскопически [8–10], зондами типа Пайпель-С1 (Пайпель-биопсия) и С2 (Эндобраш) [11–20] или схожей с зондом С2 конструкцией с наружным и внутренним проводниками [21, 22]. В большинстве исследований предпринимаются дополнительные меры для снижения риска контаминации, включая предварительную обработку влагалища/цервикаса физиологическим раствором или антисептиками и сравнительный анализ микробиоты разных отделов репродуктивного тракта [6, 7, 9–22]. Однако надежность этих подходов, особенно в контексте молекулярно-генетической диагностики, остается предметом дискуссий. По результатам исследования трансцервикально собранных образцов эндометрия были выявлены ассоциации между микробиотой эндометрия и невынашиванием беременности [23], хроническим эндометритом [24], эндометриальными полипами [10, 18], гиперплазией эндометрия [20], эндометриозом [25] и синдромом поликистозных яичников [26].

Из-за особенностей анатомии женского урогенитального тракта (УГТ) любой способ трансцервикального взятия биоматериала из полости матки сопровождается рисками контаминации образца вагинальной и особенно цервикальной микробиотой, тем более, что проба эндометрия содержит заведомо меньшее количество микроорганизмов [4]. Большая часть представленных работ не описывают возможного влияния данной контаминации на полученные результаты, что заставляет задуматься о реальном происхождении полученной микробиоты. Этот методологический пробел ставит под вопрос обоснованность заключений в части опубликованных данных о «микробиоме эндометрия», который может представлять собой смесь микробиоты цервикса и эндометрия или же артефакт, вызванный контаминацией. Помимо возможного искажения результатов микробиологического исследования, важно отметить, что трансцервикальное взятие материала из полости матки является инвазивной процедурой, сопровождающейся риском заноса патогенных микроорганизмов из нижних отделов УГТ.

Принимая во внимание вышеизложенные риски, нужно основательно взвешивать все возможности и потенциальные ограничения исследования микробиоты эндометрия в трансцервикально отобранных образцах, в том числе с использованием зондов типа Пайпель С1 и С2 как наиболее популярных инструментов, используемых с данной целью [11–20]. Для оценки данных возможностей и ограничений необходимо понимать

реальную эффективность зондов типа Пайпель С1 и С2 в предотвращении контаминации эндометриальных образцов цервикальной микробиотой.

Цель исследования — экспериментально оценить эффективность урогенитальных зондов типов С1 и С2 в предотвращении контаминации цервикальной микробиотой образцов эндометрия, предназначенных для исследования микробиоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработка экспериментальной модели шейки матки

Для экспериментальной оценки эффективности зондов была разработана *in vitro* модель, имитирующая прохождение через цервикальный канал, заполненный слизью с бактериями.

Изготовление анатомических моделей шейки матки

Модели цервикального канала двух типов создавали из 2%-й агарозы. Были разработаны два типа моделей: модель с цилиндрическим каналом ($n = 18$), имитирующая шейку матки нерожавшей женщины, и модель со щелевидным каналом ($n = 18$), имитирующая шейку матки рожавшей женщины.

В стерильные пробирки типа Эппендорф со срезанным дном и с отверстием диаметром 5 мм в крышке помещали формообразующие стержни: для цилиндрического канала — стержень диаметром 1,5 мм (внутренняя часть зонда С2), для щелевидного канала — глянцевую призму $3 \times 0,5$ мм. Пробирки заполняли агарозой и после полимеризации извлекали формовочные элементы. Оба отверстия пробирки (дно и крышка) герметизировали слоями стерильной парафиновой ленты. Непосредственно перед экспериментом цервикальные каналы моделей заполняли приготовленной модельной слизью и инкубировали при 37 °С. Фото готовых моделей представлены на рис. 1.

Приготовление модели цервикальной слизи

Непосредственно перед экспериментом готовили модель цервикальной слизи на основе нестерильного геля из желатина (желатин быстрорастворимый пищевой в гранулах 220 блюм, Тилло Желло, Таджикистан) и альгината натрия (порошок Альгината натрия пищевого вязкость 300–400, Qingdao Nanshan Yuanquan Seaweed Co., Ltd., Китай). Сначала готовили два отдельных раствора: 4%-й раствор желатина (40 мг в 1 мл стерильной воды с 20 мкл 10% CaCl_2) и 3%-й раствор альгината натрия (30 мг в 1 мл стерильной воды). Оба исходных раствора инкубировали при 60 °С в течение 30 мин в термостате «Гном» («ДНК-Технология», Россия) и тщательно перемешивали на вортексе.

Равные объемы (по 2 мл) приготовленных растворов переносили в отдельные шприцы, соединяли переходником Luer Lock и аккуратно перемешивали вручную в течение 2 мин, в результате получали финальный гель с концентрацией 2% желатина и 1,5% альгината натрия, растяжимостью 1–2 см. Для целенаправленной контаминации слизи в шприц с финальным гелем аспирировали 200 мкл смеси бактериальных культур, содержащей равные объемы клинических изолятов *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* (оптическая плотность 0,5 по Макфарленду для каждого). После добавления бактерий гель повторно перемешивали через переходник для

равномерного распределения микроорганизмов. Для приготовления демонстрационных моделей с целью лучшей визуализации цервикального канала в слизь дополнительно вносили 0,3%-й водный раствор метиленового синего.

Использованные для отбора проб зонды

Для отбора проб использовали три типа зондов (рис. 2): универсальный урогенитальный зонд А2 («Медицинские изделия», Россия); зонд типа С «Пайпель», модель 1 («Юникорнмед», Китай); зонд типа С «Пайпель», модель 2 («Юникорнмед», Китай). Зонд А2 использовали для отбора проб цервикальной слизи из канала модели шейки матки, зонды типа «Пайпель» — для взятия пробы воздуха после прохождения цервикального канала моделями шейки матки (имитация стерильной полости матки).

Дизайн исследования и протокол взятия проб

В общей сложности использовали 36 моделей шейки матки: 18 с цилиндрическим и 18 с щелевидным каналом. Для каждого экспериментального запуска использовали по три модели с цилиндрическим и три модели со щелевидным каналом. Всего было проведено по три независимых повторных эксперимента для зондов типа С1 и для зондов типа С2. Протокол взятия проб включал два этапа.

На первом этапе универсальным зондом типа А2 забирали пробу слизи из цервикального канала с глубины 1–1,5 см и переносили ее в стерильный физиологический раствор.

На втором этапе, после взятия цервикальной пробы, зондом типа С1 или С2 полностью проходили цервикальный канал для забора пробы за пределами внутреннего зева (имитация полости матки). При использовании зонда С1 после выхода на 3 см за пределы канала аспирировали пробу воздуха. При использовании зонда С2 щетку раскрывали, совершали несколько поворотных движений и закрывали.

После взятия пробы зонд извлекали (С2, в закрытом состоянии), наружную поверхность обрабатывали 96%-м этанолом для удаления остатков цервикальной слизи и предотвращения контаминации пробы ее микробиотой, после чего пробу переносили в физиологический раствор. В качестве отрицательного контрольного образца (ОКО) в конце каждого эксперимента выполняли забор пробы воздуха зондами С1/С2 без предварительного прохождения через модельную систему.

Молекулярно-генетический анализ

Выделение тотальной ДНК из всех образцов проводили с использованием набора «Проба-НК-ПЛЮС» («ДНК-Технология», Россия). Количественный анализ микробиоты выполняли с помощью ПЦР-набора «Андрофлор» («ДНК-Технология», Россия) с детекцией следующих мишеней: общая бактериальная масса (ОБМ), *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp. и группы *Enterobacteriaceae/Enterococcus* (группа ЕЕ). Минимальный порог обнаружения для ОБМ и всех целевых групп микроорганизмов — 10^3 геном-эквивалентов на образец (ГЭ/образец). Для каждого отобранного образца выполняли одну постановку в ПЦР. Амплификацию целевой ДНК и детекцию продуктов амплификации проводили в приборах ДТ-Прайм 5М с использованием штатного программного обеспечения производителя («ДНК-

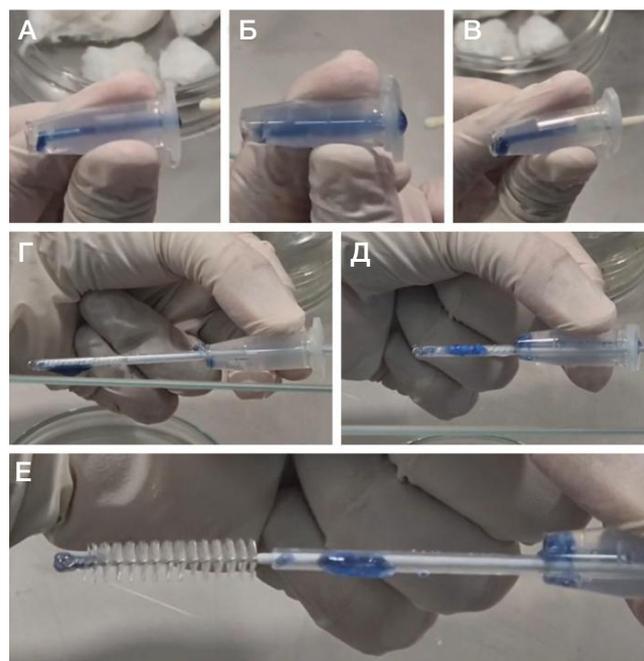


Рис. 1. Анатомические модели шейки матки с каналом, заполненным модельной желатин-альгинатной слизью. Для лучшей визуализации слизь окрашена водным раствором метиленового синего. **А.** Модель с цилиндрическим каналом. **Б.** Модель с щелевидным каналом. **В.** Взятие образца из цервикального канала универсальным зондом А2. **Г.** «Удачный» выход зондом типа Пайпель-С2 за пределы цервикального канала; зонд в закрытом виде, минимальное количество слизи на защитном проводнике. **Д.** «Неудачный» выход зондом типа Пайпель-С2 за пределы цервикального канала; зонд в закрытом виде, обильное количество слизи на защитном проводнике. **Е.** Попадание цервикальной слизи на щетку зонда из предыдущей панели после его раскрытия

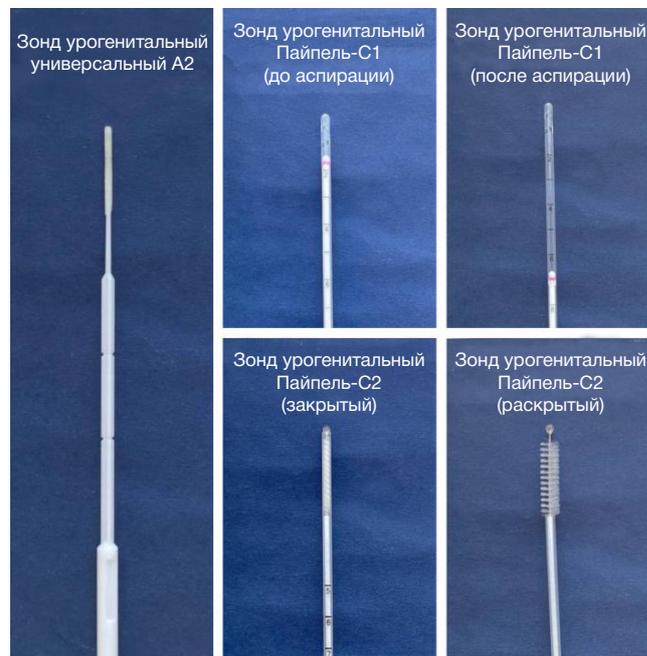


Рис. 2. Использованные для взятия биоматериала зонды. Универсальный урогенитальный зонд типа А2 для взятия модельной слизи из цервикального канала. Зонды типа Пайпель С1 и С2, использованные для отбора проб из полости матки. Зонды типа Пайпель показаны в двух состояниях: до прохождения цервикального канала (центральная панель) и после прохождения цервикального канала — в момент сбора биоматериала из полости матки (правая панель)

Технология», Россия). Результат представляли как медиану по всем экспериментальным образцам со значениями 1-го и 3-го квартилей.

Таблица 1. Микробный состав цервикальной слизи после взятия универсальным урогенитальным зондом типа А2 в моделях с цилиндрическим и щелевидным каналами. Количество микробной ДНК в ГЭ/образец (медиана, Q_1-Q_3)

Параметр	Цилиндрический канал	Щелевидный канал	p
Общая бактериальная масса	$10^{4,9}$ ($10^{4,8}-10^5$)	10^5 ($10^{4,9}-10^{5,1}$)	0,128
<i>Lactobacillus</i> spp.	$10^{3,5}$ ($10^{3,2}-10^{3,9}$)	$10^{3,7}$ ($10^{3,4}-10^{3,9}$)	0,375
<i>Staphylococcus</i> spp.	$10^{3,4}$ ($10^{3,1}-10^{3,7}$)	$10^{3,6}$ ($10^{3,2}-10^{3,9}$)	0,41
Группа ЕЕ	$10^{4,3}$ ($10^{4,1}-10^{4,6}$)	$10^{4,5}$ ($10^{4,4}-10^{4,7}$)	0,199

Оценка эффективности зондов в предотвращении контаминации

Для оценки эффективности зондов в предотвращении контаминации цервикальной микробиотой для каждой модели рассчитывали процент переноса бактериальной ДНК из цервикальной слизи в свободную от бактериальной ДНК пробу полости матки по формуле:

$$\% \text{ переноса} = \frac{\text{ДНК}_{\text{МО, полость матки (C1/C2)}}}{\text{ДНК}_{\text{МО, цервикальная слизь (A2)}}} \times 100\%,$$

где % переноса — процент перенесенной ДНК-матрицы; $\text{ДНК}_{\text{МО, полость матки (C1/C2)}}$ — количество ДНК целевого микроорганизма в пробе «стерильной полости матки», отобранной исследуемым зондом С1 или С2; $\text{ДНК}_{\text{МО, цервикальная слизь (A2)}}$ — количество ДНК целевого микроорганизма в цервикальной слизи той же модели, отобранной универсальным зондом А2.

Статистический анализ

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в среде R версия 4.5.2 (R Foundation for Statistical Computing; Вена, Австрия). Количественные показатели представлены в виде медианы и значений 1-го и 3-го квартилей. Для сравнения двух независимых групп применяли непараметрический U -критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходный состав микробиоты моделей

Для оценки исходной контаминации цервикальной слизи отобрали образцы из всех 36 анатомических моделей

Таблица 2. Микробный состав цервикальной слизи в моделях, использованных для оценки эффективности зондов С1 и С2. Количество микробной ДНК в ГЭ/образец (медиана, Q_1-Q_3)

Параметр	Тип С1 (Пайпель-биопсия)	Тип С2 (Эндобраш)	p
Общая бактериальная масса	10^5 ($10^{4,9}-10^5$)	$10^{4,9}$ ($10^{4,8}-10^{5,1}$)	0,612
<i>Lactobacillus</i> spp.	$10^{3,8}$ ($10^{3,4}-10^{3,9}$)	$10^{3,6}$ ($10^{3,3}-10^{3,8}$)	0,526
<i>Staphylococcus</i> spp.	$10^{3,1}$ ($10^{2,9}-10^{3,4}$)	$10^{3,8}$ ($10^{3,5}-10^4$)	< 0,001
Группа ЕЕ	$10^{4,6}$ ($10^{4,4}-10^{4,8}$)	$10^{4,4}$ ($10^{4,2}-10^{4,5}$)	0,049

Таблица 3. Эффективность урогенитальных зондов типа С1 и С2 в предотвращении контаминации микроорганизмами цервикальной слизи. Уровень контаминации, % переноса ДНК из цервикальной слизи (медиана, Q_1-Q_3)

Параметр	Тип С1 (Пайпель-биопсия)	Тип С2 (Эндобраш)	p
Общая бактериальная масса	81,6 (54,4–107)	29,8 (14,8–56,3)	0,009
<i>Lactobacillus</i> spp.	25,8 (0–38,7)	36,2 (24,8–61,2)	0,078
<i>Staphylococcus</i> spp.	0 (0–0)	14,8 (0–27,2)	0,004
Группа ЕЕ	27,6 (11,5–38,7)	19 (9,6–29,4)	0,428

шейки матки (18 с цилиндрическим и 18 с щелевидным каналом) с помощью универсального зонда типа А2. Микробные составы образцов, отобранных из моделей с цилиндрическим и щелевидным каналами, статистически значимо не различались (табл. 1). Медианные уровни бактериальной ДНК были сопоставимы между группами моделей по всем исследуемым параметрам: ОБМ ($10^{4,9}$ и 10^5 , $p = 0,128$), *Lactobacillus* spp. ($10^{3,5}$ и $10^{3,7}$, $p = 0,375$), *Staphylococcus* spp. ($10^{3,4}$ и $10^{3,6}$, $p = 0,410$) и группе ЕЕ ($10^{4,3}$ и $10^{4,5}$, $p = 0,199$).

Эффективность зондов Пайпель-С1 и Пайпель-С2

Перед сравнительным анализом эффективности зондов С1 и С2 проводили проверку сопоставимости исходных моделей, предназначенных для их тестирования. Выявлено, что в группе моделей для зонда С1 исходное содержание *Staphylococcus* spp. было статистически значимо ниже ($10^{3,1}$ против $10^{3,8}$, $p < 0,001$), а бактерий группы ЕЕ — значимо выше ($10^{4,6}$ против $10^{4,4}$, $p = 0,049$), чем в группе для зонда С2. Уровни ОБМ (10^5 и $10^{4,9}$, $p = 0,612$) и *Lactobacillus* spp. ($10^{3,8}$ и $10^{3,6}$, $p = 0,526$) между группами значимо не различались (табл. 2).

При использовании зондов Пайпель-С1 наблюдали значительный перенос бактериальной ДНК из цервикальной слизи в стерильные образцы «полости матки». Уровень переноса ОБМ варьировал от 14 до 172% (медиана — 81,6%, Q_1-Q_3 : 54,4–107%; табл. 3). В 12 из 18 моделей перенос составил менее 100%, в шести пробах количество ОБМ в стерильных образцах полости матки превысило исходный уровень в цервикальной слизи. Уровень переноса ДНК специфичных групп бактерий составил для *Lactobacillus* spp. — 25,8% (0–38,7%), для группы ЕЕ — 27,6% (11,5–38,7%), для *Staphylococcus* spp. — 0% (0–0%), в 100% случаев ниже порога детекции (10^3 ГЭ/образец).

При использовании зондов Пайпель-С2 отмечали перенос от 3,9 до 131% бактериальной ДНК (ОБМ) из

Таблица 4. Эффективность зондов Пайпель-С1 и С2 в зависимости от формы цервикального канала. Уровень контаминации, % переноса ДНК из цервикальной слизи (медиана, Q_1 – Q_3)

Параметр	Цилиндрический канал	Щелевидный канал	<i>p</i>
Зонд Пайпель-С1			
Общая бактериальная масса	71,3 (54,4–107)	81,6 (54,4–107)	0,73
<i>Lactobacillus</i> spp.	0 (0–29,6)	35,2 (25,8–67,1)	0,032
<i>Staphylococcus</i> spp.	0 (0–0)	0 (0–0)	0,35
Группа ЕЕ	19,7 (4,7–27,6)	37,5 (32,4–51,7)	0,027
Зонд Пайпель-С2			
Общая бактериальная масса	50,8 (24,1–100)	17,2 (9,3–33,8)	0,052
<i>Lactobacillus</i> spp.	41,5 (31,6–76,3)	33,8 (22,5–41,5)	0,309
<i>Staphylococcus</i> spp.	19,7 (0–44,4)	10 (0–24,1)	0,413
Группа ЕЕ	19,7 (18,4–62,2)	16,1 (8,2–19,7)	0,136

цервикальной слизи в стерильные образцы полости матки (медиана — 29,8%, Q_1 – Q_3 : 14,8–56,3%, статистически значимо меньше, чем для типа С1, $p = 0,009$; табл. 3). В 12 из 18 моделей перенос составил менее 50%, в четырех пробах — от 50 до 100%, в двух пробах количество ОБМ в стерильных образцах полости матки превысило исходный уровень в цервикальной слизи. Уровень переноса для *Lactobacillus* spp. и группы ЕЕ был сопоставим с показателями зонда С1 и составил 36,2% (24,8–61,2%) и 19% (9,6–29,4%) соответственно. Уровень переноса *Staphylococcus* spp. оказался значимо выше, чем для зондов С1, и составил 14,8% (0–27,2%) ($p = 0,004$).

Влияние формы канала на эффективность зондов Пайпель-С1 и Пайпель-С2

Зонды С1 и С2 различались по эффективности в зависимости от формы цервикального канала и группы микроорганизмов (табл. 4).

Для зонда С1 в цилиндрических каналах наблюдали значительно меньший уровень контаминации *Lactobacillus* spp. (0% против 35,2%, $p = 0,032$) и группой ЕЕ (19,7% против 37,5%, $p = 0,027$). Для *Staphylococcus* spp. (0% против 0%, $p = 0,350$) и ОБМ (71,3% против 81,6%, $p = 0,730$) значимых различий между формами каналов не выявлено.

Для зонда С2, напротив, отмечена тенденция к лучшим показателям в щелевидных каналах по уровню контаминации ОБМ (17,2% против 50,8%, $p = 0,052$), тогда как для остальных параметров уровни контаминации были сопоставимы между моделями с цилиндрическим и щелевидным каналами: *Lactobacillus* spp. (41,5% против 33,8%, $p = 0,309$), *Staphylococcus* spp. (19,7% против 10%, $p = 0,413$) и группа ЕЕ (19,7% против 16,1%, $p = 0,136$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В большинстве исследований микробиоты эндометрия перед трансцервикальным взятием пробы предпринимаются меры по снижению риска контаминации, включая визуальный контроль и обработку физиологическим раствором/антисептиками [6, 7, 9–13, 15–22]. Однако вызывает сомнение эффективность антисептиков в деконтаминации в силу короткой экспозиции, особенно в случае молекулярно-генетических исследований, которые детектируют ДНК как живых, так и погибших микроорганизмов. Скорее эффект антисептиков будет обусловлен только механическим удалением части микробных клеток. Авторы ряда работ дополнительно анализируют микробиоту влагалища

и/или цервикального канала [6, 13, 14, 16, 17, 19, 22], что позволяет выявить грубые случаи контаминации из дистальных отделов, но не решает проблему смешения микробиот разных анатомических ниш.

Изначальное назначение зондов типа Пайпель С1/С2 — взятие образцов эндометрия для гистологических или цитологических исследований [27, 28]. Аспирацию образца в случае использования зонда типа С1 производят только после прохождения цервикального канала [27]. Зонд типа С2 снабжен специальным защитным проводником, который предохраняет расположенную внутри него щетку от контакта со слизистой цервикального канала; щетка раскрывается только после введения в полость матки, а перед извлечением задвигается внутрь проводника. Данные конструктивные решения позволяют минимизировать попадание в образец клеток цервикального происхождения.

При использовании зондов С1/С2 для микробиологического исследования эндометрия предполагается, что их конструкция обеспечит защиту от контаминации цервикальной микробиотой. Однако в этом случае необходимо учитывать два критических нюанса: заведомо меньшее количество бактерий в полости матки по сравнению с цервикальным каналом [4] и невозможность дифференцировать происхождение бактерий в образце (в отличие от гисто- и цитологических исследований, где клетки цервикса и эндометрия различаются по морфологии).

Для оценки реального риска контаминации в полностью контролируемых условиях, исключающих ограничения клинических методов контроля, нами была разработана экспериментальная *in vitro* модель, имитирующая проходжение через цервикальный канал, заполненный слизью с бактериями (рис. 1). Растяжимость использованной в моделях цервикальной слизи составляла 1–2 см, что соответствовало средней растяжимости реальной цервикальной слизи в пролиферативную фазу менструального цикла [29]. Общее количество бактериальной ДНК (ОБМ) в образцах модельной слизи составляло 10^5 ГЭ/образец, что соответствовало медианному уровню ОБМ в цервикальных образцах женщин при использовании аналогичной ПЦР тест-системы в ранее проведенных нами исследованиях (неопубликованные данные). Возможное присутствие в геле нецелевой бактериальной ДНК не являлось препятствием для решения поставленной задачи, поскольку контаминацию оценивали по проценту микробной ДНК-матрицы, перенесенной в эндометриальную пробу из пробы цервикальной слизи той же модели.

Медианный уровень переноса бактериальной ДНК из цервикальной слизи в образцы полости матки составил 81,6% и 29,8% для зондов типа С1 и С2 соответственно (табл. 3). Обычно количество бактериальной ДНК в пробах из полости матки не превышает или ниже количества бактериальной ДНК в цервикальном канале [4, 5], поэтому такой перенос приводит к существенному или даже критическому искажению результатов. При использовании зондов С1 фактически вместо исследования эндометриального образца происходило повторное исследование пробы из цервикального канала. В шести из 18 случаев взятия зондами типа С1 и в двух из 18 случаев взятия зондами типа С2 концентрация бактериальной ДНК в эндометриальной пробе оказалась даже выше, чем в цервикальной пробе, что может быть связано с более эффективным взятием цервикальной слизи зондами С1/С2 по сравнению с зондом А2 для данных пар образцов.

Уровни переноса ДНК *Lactobacillus* spp. и группы ЕЕ значимо не отличались при использовании зондов С1 и С2: медианные уровни переноса составили 19–36,2%. Для *Staphylococcus* spp. уровень переноса для зондов С1 оказался значимо ниже, чем для зондов С2 (0% против 14,8%, $p = 0,004$). Однако эти различия, вероятнее всего, объяснимы исходно низким содержанием *Staphylococcus* spp. в моделях, использованных для тестирования зондов С1 ($10^{3,1}$ против $10^{3,8}$ в моделях для зондов С2, $p < 0,001$) (табл. 2). Разница в исходных концентрациях, в свою очередь, вероятно, обусловлена разрушением стафилококков с деградацией их ДНК в исходной смеси микроорганизмов, которая хранилась в холодильнике в течение трех недель между сериями экспериментов (серия экспериментов с зондами С1 была проведена после получения результатов экспериментов с зондами С2). При аналитической чувствительности использованной ПЦР тест-системы 10^3 ГЭ/образец практически любое снижение от исходной концентрации $10^{3,1}$ приводило к отрицательному результату для данной группы микроорганизмов.

Результаты исследования продемонстрировали зависимость между формой цервикального канала и уровнем переноса бактериальной ДНК (табл. 4). При использовании зондов С1 отмечен значимо больший перенос ДНК *Lactobacillus* spp. и группы ЕЕ в случае щелевидной формы каналов (типичная форма цервикального канала для рожавших женщин). Тогда как при использовании зондов типа С2 отмечали тенденцию к большему переносу ОБМ для моделей шеек матки с цилиндрической формой каналов (типичная форма цервикального канала у нерожавших женщин).

Следует отметить, что нам скорее всего не удалось полностью воссоздать реальные условия: сопротивление стенок цервикального канала, химический состав и точные реологические свойства слизи, возможный градиент микроорганизмов в цервикальном канале. Следовательно, полученные значения процента переноса бактериальной ДНК не могут быть напрямую экстраполированы на клиническую практику. Тем не менее, результаты убедительно демонстрируют, что взятие биоматериала из полости матки зондами типа Пайпель-С1 и Пайпель-С2 всегда сопровождается переносом части

цервикальной микробиоты в эндометриальный образец. Основная контаминация при взятии пробы зондом С2, по всей видимости, происходит после прохождения цервикального канала — в момент раскрытия зонда в полости матки на щетку попадает цервикальная слизь, налипшая на защитный проводник во время прохождения цервикального канала (рис. 1Д, Е). Можно предположить, что аналогичная проблема возникает и при использовании других вариантов трансцервикального взятия образцов, поскольку любое устройство для взятия фиксирует на себе и проталкивает цервикальную слизь в полость матки. Более того, трансцервикальное взятие биоматериала в секреторную фазу, может приводить к еще большей контаминации из-за увеличения растяжимости слизи [29].

Установленный факт контаминации цервикальной микробиотой при использовании зондов типа Пайпель С1/С2, с одной стороны, ставит под сомнение эндометриальное происхождение микробиоты в подобных образцах, а с другой — подтверждает реальный риск ятрогенного заноса инфекции в полость матки при выполнении данной процедуры. В связи с принципиальной невозможностью разделения цервикальной и эндометриальной микробиоты в полученных образцах представляется логичной переориентация исследований с анализа «микробиоты эндометрия» на изучение совокупной цервико-эндометриальной микробиоты в общем образце, взятом одновременно из цервикального канала и полости матки.

Выводы

В проведенном исследовании урогенитальные зонды типа Пайпель-С1 и Пайпель-С2 не обеспечивали надежной защиты эндометриальных образцов от контаминации цервикальной микробиотой. Оба типа зондов пропускали значительное количество бактериальной ДНК: медианный уровень переноса составил 81,6% для С1 и 29,8% для С2. Хотя для зонда С2 отмечали 2,5–3-кратное превосходство в эффективности по сравнению с С1, уровень контаминации в 29,8% до сих пор является критическим, учитывая что у большинства пациенток количество микроорганизмов в полости матки заведомо ниже, чем в цервикальном канале. Эффективность зондов зависела от анатомической формы цервикального канала и исследуемой группы микроорганизмов: для зонда С1 эффективность значимо снижалась в щелевидных каналах для *Lactobacillus* spp. и *Enterococcus/Enterobacteriaceae*, тогда как для зонда С2 отмечена тенденция к ухудшению показателей в цилиндрических каналах по уровню общей бактериальной контаминации. Полученные данные заставляют переосмыслить результаты исследования микробиоты полости матки в образцах, полученных с помощью зондов типов Пайпель-С1 и Пайпель-С2, а также других способов трансцервикального отбора проб. В качестве конструктивной альтернативы представляется целесообразным переориентировать исследования с анализа микробиоты эндометрия на изучение совокупной цервико-эндометриальной микробиоты в общем образце, взятом одновременно из цервикального канала и полости матки, что позволит избежать методологических артефактов, связанных с контаминацией.

Литература

- Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2015; 212 (5): 611.e1–611.e9.
- Polifke A, Schwedler A von, Gulba R, Bensmann R, Dilthey A, Nassar NN, et al. Differential characteristics of vaginal versus endometrial microbiota in IVF patients. *Sci Rep.* 2024; 14 (1).
- Franasiak JM, Scott RT. Endometrial microbiome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017; 29 (3): 146–52.
- Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun.* 2017; 8: 875.
- Winters AD, Romero R, Gervasi M, Gomez-Lopez N, Tran MR, Garcia-Flores V, et al. Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? *Sci Rep.* 2019; 9: 9905.
- Riganelli L, Iebba V, Piccioni M, Illuminati I, Bonfiglio G, Neroni B, et al. Structural Variations of Vaginal and Endometrial Microbiota: Hints on Female Infertility. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 350.
- Кебурия Л. К., Смольникова В. Ю., Припутневич Т. В., Муравьева В. В., Трофимов Д. Ю., Шубина Е. С. и др. Микробиота полости матки и неудачи имплантации. Есть ли связь? *Акушерство и гинекология.* 2021; 7: 133–43.
- Тапильская Н. И., Будиловская О. В., Крысанова А. А., Толибова Г. Х., Копылова А. А., Цыпурдеева Н. Д. и др. Микробиота эндометрия женщин с хроническим эндометритом и идиопатическим бесплодием. *Акушерство и гинекология.* 2020; 4: 72–81.
- Qiu T, Liu L, Zhou H, Sheng H, He Y, Liu M, et al. Analysis of endometrial microbiota in intrauterine adhesion by high-throughput sequencing. *Ann Transl Med.* 2021; 9 (3): 195.
- Ванакова А. И., Долгушина Н. В., Денисов П. А., Гончарук О. Д., Муравьева В. В., Припутневич Т. В. Особенности микробиоты полости матки у пациенток с полипами эндометрия. *Вестник Российского государственного медицинского университета.* 2025; 1 (6): 6.
- Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui R, Vankeirsbilck N, Weyers S, et al. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *Peer J.* 2016; 4: e1602.
- Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Копосова О. В., Исламиди Д. К., Игнатова К. Ю., Абакумова Е. И. и др. Возможности оценки микробиоты полости матки с использованием ПЦР в реальном времени. *Вестник РГМУ.* 2020; 1: 14–21.
- Карахалис Л. Ю., Кононенко Т. С. Таксономический профиль микробиома эндометрия при хроническом эндометрите. *Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения.* 2022; 10 (4): 23–30.
- Peuranpää P, Holster T, Saqib S, Kalliala I, Tiitinen A, Salonen A, et al. Female reproductive tract microbiota and recurrent pregnancy loss: a nested case-control study. *Reproductive BioMedicine Online.* 2022; 45 (5): 1021–1031.
- Bui BN, van Hoogenhuijze N, Viveen M, Mol F, Teklenburg G, de Bruin J-P, et al. The endometrial microbiota of women with or without a live birth within 12 months after a first failed IVF/ICSI cycle. *Scientific reports.* 2023; 13 (1): 3444.
- Jain M, Mladova E, Dobychnina A, Kirillova K, Shichanina A, Anokhin D, et al. Comparison of microbial profiles and viral status along the vagina-cervix-endometrium continuum of infertile patients. *Systems Biology in Reproductive Medicine.* 2023; 69 (4): 310–19.
- Zhang R, Wang M, Zhong J, Xue H. Altered endometrial microbiota profile is associated with poor endometrial receptivity of repeated implantation failure. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2024; 92 (5): e70005.
- Zhao Y, Liao Y, Xu G, Wang Y. Endometrial microbiota alteration in female patients with endometrial polyps based on 16S rRNA gene sequencing analysis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024; 14: 1351329.
- Крысанова А. А., Сторожева К. В., Будиловская О. В., Хуснутдинова Т. А., Шалепо К. В., Тапильская Н. И. и др. Архитектоника микробиоты эндометрия у женщин с бесплодием различного генеза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2024; 69 (9): 478–86.
- Ying X, et al. An altered uterine microbiota with endometrial hyperplasia. *BMC Microbiol.* 2024; 24 (1): 258.
- Liu Y, Wong KKW, Ko EYL, Chen X, Huang J, Tsui SKW, et al. Systematic comparison of bacterial colonization of endometrial tissue and fluid samples in recurrent miscarriage patients: implications for future endometrial microbiome studies. *Clin Chem.* 2018; 64 (12): 1743–52.
- Reschini M, Benaglia L, Ceriotti F, Borroni R, Ferrari S, Castiglioni M, et al. Endometrial microbiome: sampling, assessment, and possible impact on embryo implantation. *Sci Rep.* 2022; 12: 8467.
- Moreno I, et al. The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2020; 222 (4): 296–305.
- Zhang H, Zou H, Zhang C, Li X, Wang Z, Liu C, et al. Chronic endometritis and the endometrial microbiota: implications for reproductive success in patients with recurrent implantation failure. *Ann Clin MicrobiolAntimicrob.* 2024; 23: 49.
- Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016; 199: 69–75.
- Lee S, et al. The reproductive tract microbiome in women with polycystic ovary syndrome and across different menstrual cycle phases. *Hum Reprod.* 2025; 40 (3): 518–28.
- Cornier E. The Pipelle: a disposable device for endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* 1984; 148 (1): 109–10.
- Vuopala S, Klemi PJ, Mäenpää J, Salmi T, Mäkäräinen L. Endobrush sampling for endometrial cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1989; 68 (4): 345350.
- Cohen MR, Stein IF, Kaye BM. Spinnbarkeit: A Characteristic of Cervical Mucus: Significance at Ovulation Time. *Fertil Steril.* 1952; 3 (3): 201–09.

References

- Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2015; 212 (5): 611.e1–611.e9.
- Polifke A, Schwedler A von, Gulba R, Bensmann R, Dilthey A, Nassar NN, et al. Differential characteristics of vaginal versus endometrial microbiota in IVF patients. *Sci Rep.* 2024; 14 (1).
- Franasiak JM, Scott RT. Endometrial microbiome. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2017; 29 (3): 146–52.
- Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun.* 2017; 8: 875.
- Winters AD, Romero R, Gervasi M, Gomez-Lopez N, Tran MR, Garcia-Flores V, et al. Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? *Sci Rep.* 2019; 9: 9905.
- Riganelli L, Iebba V, Piccioni M, Illuminati I, Bonfiglio G, Neroni B, et al. Structural Variations of Vaginal and Endometrial Microbiota: Hints on Female Infertility. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 350.
- Кебурия ЛК, Смольникова ВЮ, Припутневич ТВ, Муравьева ВВ, Трофимов ДЮ, Шубина ЕС, и др. Микробиота полости матки и неудачи имплантации. Est' li svyaz'? *Акушерство и гинекология.* 2021; 7: 133–43. Russian.
- Тапильская НИ, Будиловская ОВ, Крысанова АА, Толибова ГХ, Копылова АА, Цыпурдеева НД, и др. Микробиота эндометрия женщин с хроническим эндометритом и идиопатическим бесплодием. *Акушерство и гинекология.* 2020; 4: 72–81. Russian.
- Qiu T, Liu L, Zhou H, Sheng H, He Y, Liu M, et al. Analysis of endometrial microbiota in intrauterine adhesion by high-throughput sequencing. *Ann Transl Med.* 2021; 9 (3): 195.
- Ванакова АИ, Долгушина НВ, Денисов ПА, Гончарук ОД,

- Muraveva VV, Pripitnevich TV. Osobennosti mikrobioty polosti matki u pacientok s polipami endometriya. Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. 2025; 1 (6): 6. Russian.
11. Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui R, Vankeirsbilck N, Weyers S, et al. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. Peer J. 2016; 4: e1602.
 12. Voroshilina ES, Zornikov DL, Kuposova OV, Islamidi DK, Ignatova KYu, Abakumova EI, i dr. Vozможности ocenki mikrobioty polosti matki s ispol'zovaniem PCR v real'nom vremeni. Vestnik RGMU. 2020; 1: 14–21. Russian.
 13. Karahalys LYu, Kononenko TS. Taksonomicheskij profil' mikrobioma endometriya pri hronicheskom endometrite. Akusherstvo i ginekologiya: Novosti. Mneniya. Obucheniya. 2022; 10 (4): 23–30. Russian.
 14. Peuranpää P, Holster T, Saqib S, Kalliala I, Tiitinen A, Salonen A, et al. Female reproductive tract microbiota and recurrent pregnancy loss: a nested case-control study. Reproductive BioMedicine Online. 2022; 45 (5): 1021–1031.
 15. Bui BN, van Hoogenhuijze N, Viveen M, Mol F, Teklenburg G, de Bruin J-P, et al. The endometrial microbiota of women with or without a live birth within 12 months after a first failed IVF/ICSI cycle. Scientific reports. 2023; 13 (1): 3444.
 16. Jain M, Mladova E, Dobychina A, Kirillova K, Shichanina A, Anokhin D, et al. Comparison of microbial profiles and viral status along the vagina-cervix-endometrium continuum of infertile patients. Systems Biology in Reproductive Medicine. 2023; 69 (4): 310–19.
 17. Zhang R, Wang M, Zhong J, Xue H. Altered endometrial microbiota profile is associated with poor endometrial receptivity of repeated implantation failure. American Journal of Reproductive Immunology. 2024; 92 (5): e70005.
 18. Zhao Y, Liao Y, Xu G, Wang Y. Endometrial microbiota alteration in female patients with endometrial polyps based on 16S rRNA gene sequencing analysis. Front Cell Infect Microbiol. 2024; 14: 1351329.
 19. Krysanova AA, Storozheva KV, Budilovskaya OV, Husnutdinova TA, SHalepo KV, Tapilskaya NI, i dr. Arhitektonika mikrobioty endometriya u zhenshchin s besplodiem razlichnogo geneza. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2024; 69 (9): 478–86.
 20. Ying X, et al. An altered uterine microbiota with endometrial hyperplasia. BMC Microbiol. 2024; 24 (1): 258.
 21. Liu Y, Wong KKW, Ko EYL, Chen X, Huang J, Tsui SKW, et al. Systematic comparison of bacterial colonization of endometrial tissue and fluid samples in recurrent miscarriage patients: implications for future endometrial microbiome studies. Clin Chem. 2018; 64 (12): 1743–52.
 22. Reschini M, Benaglia L, Ceriotti F, Borroni R, Ferrari S, Castiglioni M, et al. Endometrial microbiome: sampling, assessment, and possible impact on embryo implantation. Sci Rep. 2022; 12: 8467.
 23. Moreno I, et al. The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2020; 222 (4): 296–305.
 24. Zhang H, Zou H, Zhang C, Li X, Wang Z, Liu C, et al. Chronic endometritis and the endometrial microbiota: implications for reproductive success in patients with recurrent implantation failure. Ann Clin MicrobiolAntimicrob. 2024; 23: 49.
 25. Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016; 199: 69–75.
 26. Lee S, et al. The reproductive tract microbiome in women with polycystic ovary syndrome and across different menstrual cycle phases. Hum Reprod. 2025; 40 (3): 518–28.
 27. Cornier E. The Pipelle: a disposable device for endometrial biopsy. Am J Obstet Gynecol. 1984; 148 (1): 109–10.
 28. Vuopala S, Klemi PJ, Mäenpää J, Salmi T, Mäkäräinen L. Endobrush sampling for endometrial cancer. Acta Obstet Gynecol Scand. 1989; 68 (4): 345350.
 29. Cohen MR, Stein IF, Kaye BM. Spinnbarkeit: A Characteristic of Cervical Mucus: Significance at Ovulation Time. Fertil Steril. 1952; 3 (3): 201–09.

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТАТУСА ПАЦИЕНТОК ПРИ ЭНДОМЕТРИТ-АССОЦИИРОВАННОМ БЕСПЛОДИИ

О. Е. Савельева [✉], Т. А. Криволезова, А. С. Жигалина, Л. П. Сигарева, А. В. Сабуров, В. А. Резник

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Среди заболеваний эндометрия, снижающих его репродуктивный потенциал, ведущую роль играет хронический эндометрит (ХЭ). Патогенетически значимые воспалительные маркеры, такие как цитокины, воспалительные белки и гематологические индексы, пока не нашли широкого применения в медицинской практике для диагностики ХЭ. Цель исследования — оценить у пациенток с бесплодием показатели системного воспалительного статуса, включая гематологические лабораторные параметры и воспалительные индексы, и определить их диагностическую значимость при ХЭ. Представлены данные исследования 50 пациенток с бесплодием. Подсчет количества лейкоцитов крови проводили стандартным гематологическим методом. На основе клеточного состава крови рассчитывали воспалительные индексы NLR, MLR, PLR и SII. Концентрацию СРБ в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. У пациенток с бесплодием, ассоциированным с ХЭ, абсолютное и относительное количество лимфоцитов было ниже ($p = 0,0451$ и $p = 0,0089$ соответственно), а относительное количество моноцитов и базофилов было выше ($p = 0,0469$ и $p = 0,0005$ соответственно), чем у пациенток без ХЭ. У пациенток из исследуемой группы концентрация СРБ в крови была почти в 4 раза выше, чем у пациенток из группы сравнения ($p = 0,0191$). При этом все показатели оставались в пределах нормальных значений. Сравнительный анализ индексов NLR, MLR, PLR и SII показал их статистически значимое повышение при бесплодии, ассоциированном с ХЭ ($p = 0,0387$, $p = 0,0058$, $p = 0,0335$ и $p = 0,0333$ соответственно). ROC-анализ позволил установить предиктивную значимость у индексов NLR (0,871 (95% ДИ: 0,767–0,974); $p < 0,0001$) и MLR (0,848 (95% ДИ: 0,737–0,958); $p < 0,0001$) для выявления ХЭ у пациенток с бесплодием.

Ключевые слова: хронический эндометрит, бесплодие, воспалительный статус, гематологические воспалительные индексы

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 24-25-00244.

Вклад авторов: О. Е. Савельева — дизайн исследования, анализ и интерпретация результатов, написание статьи; Т. А. Криволезова — отбор пациентов, получение результатов, написание статьи; А. С. Жигалина — получение и анализ данных, написание статьи; Л. П. Сигарева — анализ литературы, статистическая обработка результатов; А. В. Сабуров — отбор пациентов, получение результатов; В. А. Резник — планирование и руководство исследованием, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом СПбГПМУ (протокол №18/07 от 27 октября 2022 г.), проведено в соответствии с федеральными законами Российской Федерации (№ 152, 323 и др.) и Хельсинкской декларацией 1964 г. со всеми последующими дополнениями и изменениями, регламентирующими научные исследования на биоматериале, полученном у людей. Все участники подписали информированное добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Евгеньевна Савельева
ул. Литовская, д. 2, г. Санкт-Петербург, 194100, Россия; olga_chechina@mail.ru

Статья получена: 29.10.2025 **Статья принята к печати:** 03.12.2025 **Опубликована онлайн:** 15.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.071

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

CHARACTERISTICS OF SYSTEMIC INFLAMMATION IN PATIENTS WITH ENDOMETRITIS-ASSOCIATED INFERTILITY

Savelieva OE [✉], Krivolesova TA, Zhigalina AS, Sigareva LP, Saburov AV, Reznik VA

Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Chronic endometritis (CE) is the most significant endometrial disease in terms of its impact on reproductive potential. Thus far, pathogenetically significant inflammatory markers — cytokines, inflammatory proteins, and hematological indices — have not been widely used in medical practice for the diagnosis of CE. This study aimed to evaluate indicators of systemic inflammation, including hematological parameters and inflammatory indices, in patients with infertility, and to determine their diagnostic significance for CE. We analyzed the data of examinations of 50 patients with infertility. The standard hematological method was used to determine the leukocyte count. Based on the blood cell composition, we calculated the inflammatory indices NLR, MLR, PLR, and SII. The concentration of CRP in the blood serum was determined by enzyme immunoassay. In patients with CE-associated infertility, the absolute and relative numbers of lymphocytes were lower ($p = 0.0451$ and $p = 0.0089$, respectively), whereas the relative numbers of monocytes and basophils were higher ($p = 0.0469$ and $p = 0.0005$, respectively) than in patients without CE. In the study group, the concentration of CRP in the blood was almost four times higher than in the control group ($p = 0.0191$), but all indicators remained within the normal range. A comparative analysis of the NLR, MLR, PLR, and SII indices revealed their significant growth in CE-associated infertility cases ($p = 0.0387$, $p = 0.0058$, $p = 0.0335$, and $p = 0.0333$, respectively). ROC analysis established the predictive significance of NLR (0.871 (95% CI: 0.767–0.974); $p < 0.0001$) and MLR (0.848 (95% CI: 0.737–0.958); $p < 0.0001$) indices for detecting CE in infertility patients.

Keywords: chronic endometritis, infertility, inflammatory status, hematological inflammatory indexes

Funding: the work was supported by the Russian Science Foundation grant 24-25-00244.

Author contribution: OE Savelieva — study design, analysis and interpretation of results, article authoring; TA Krivolesova — selection of patients, registration of results, article authoring; AS Zhigalina — data collection and analysis, article authoring; LP Sigareva — literature analysis, statistical processing of results; AV Saburov — selection of patients, registration of results; VA Reznik — research planning and supervision, article editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of St. Petersburg State Medical University (Minutes No. 18/07 of October 27, 2022), conducted in accordance with the federal laws of the Russian Federation (No. 152, 323, etc.) and Declaration of Helsinki 1964, with all subsequent additions and amendments regulating scientific research on biomaterials obtained from humans. All participants signed an informed consent form before participating in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga E. Savelieva
Litovskaya, 2, Saint Petersburg, 194100, Russia; olga_chechina@mail.ru

Received: 29.10.2025 **Accepted:** 03.12.2025 **Published online:** 15.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.071

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/>).

На сегодняшний день прослеживается четкая тенденция к увеличению случаев хронизации воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин с вовлечением в патологический процесс иммунной и эндокринной систем [1]. Это неблагоприятным образом сказывается на репродуктивной функции пациенток и нередко приводит к снижению их фертильности вплоть до бесплодия.

Среди заболеваний эндометрия, снижающих его репродуктивный потенциал, ведущую роль играет хронический эндометрит (ХЭ). Согласно разным источникам, от ХЭ страдает 0,2–46,3% женщин репродуктивного возраста [2]. Такая широкая вариабельность данных по распространенности этого заболевания обусловлена тем, что разные исследовательские группы используют разные диагностические подходы. Хронический эндометрит — это персистирующее низкоинтенсивное воспаление эндометрия с инфильтрацией стромы иммунокомпетентными клетками, приводящее к нарушению его циклической биотрансформации и рецептивности [2, 3].

В настоящее время имеются значительные трудности в диагностике, профилактике и восстановлении репродуктивной функции у пациенток с ХЭ. Данная патология часто протекает бессимптомно или с наличием таких неспецифических симптомов, как хронические тазовые боли, слизистые или слизисто-гнойные вагинальные выделения, диспареуния, аномальные маточные кровотечения, рецидивирующий цистит [1]. Объективная оценка распространенности ХЭ затруднена бессимптомным (в большинстве случаев) течением заболевания и необходимостью проведения биопсии для верификации диагноза. Окончательную диагностику ХЭ выполняют с помощью стандартного патоморфологического исследования [3].

В последние годы число пациенток с бесплодием, сочетанным с ХЭ, неуклонно растет. Установлено, что у женщин с подтвержденным ХЭ бесплодие диагностируется в 2,8–56,8% случаев [4]. При бесплодии на фоне хронического воспалительного процесса нормальные значения лабораторных показателей и отсутствие выраженной клинической симптоматики часто сочетаются с дисфункцией клеток иммунной системы как на локальном, так и на системном уровне. Возникающий при этом деструктивный иммуновоспалительный процесс требует адекватной противовоспалительной и иммунной коррекции [5–6]. Кроме того, ХЭ является одной из причин самопроизвольного патологического прерывания беременности и повторных неудач имплантации при лечении бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий [7]. Тем не менее до сих пор нет рекомендаций по включению выявления ХЭ в клиническое обследование пациенток с бесплодием перед проведением экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

Вышеуказанное диктует поиск новых методов диагностики и лечения патологии эндометрия и нарушения его рецептивности, вызванных ХЭ. Одним из перспективных направлений исследования является изучение воспалительного статуса пациентов с бесплодием. Для этих целей в клинической практике могут быть использованы гематологические воспалительные индексы [8]. Так, воспалительный индекс NLR, представляющий собой отношение количества нейтрофилов к числу лимфоцитов крови, служит показателем системного воспаления и индикатором общего состояния иммунитета

при действии различных стрессовых стимулов [9]. Индекс PLR оценивается как отношение количества тромбоцитов к количеству лимфоцитов. Тромбоциты являются источником TGF β и VEGF, которые способствуют хронизации воспалительного процесса [10]. NLR и PLR в настоящее время все чаще используют в качестве маркеров хронического воспаления [8]. Индекс MLR используют реже и оценивают как отношение количества моноцитов к лимфоцитам. Этот индекс ассоциируется с системным воспалением [11]. Еще одним популярным воспалительным маркером в последние годы стал воспалительный индекс SII. Высокий уровень SII указывает на активацию процессов воспаления и снижение иммунной функции у пациентов [12].

Таким образом, гематологические воспалительные индексы могут оказаться высокоинформативными системными маркерами хронического воспаления с субклиническим течением при ХЭ, что позволит разработать новые стратегии противовоспалительной и иммунокорректирующей терапии, и восстановления репродуктивной функции у женщин.

Цель исследования — оценить у пациенток с бесплодием показатели системного воспалительного статуса, включая гематологические лабораторные параметры и воспалительные индексы, и определить их диагностическую значимость при ХЭ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В работу включены результаты исследования 50 пациенток в возрасте 24–43 лет (средний возраст 37 (32–40) лет): основная группа — 27 пациенток с диагнозом «женское бесплодие», ассоциированное с ХЭ, и группа сравнения — 23 пациентки без признаков ХЭ с бесплодием, связанным с мужским фактором. В исследовании участвовали пациентки, проходящие обследование и подготовку к ЭКО в отделении вспомогательных репродуктивных технологий. Пациенткам было проведено УЗИ-исследование с доплерометрией маточных артерий на 12-й и более день менструального цикла с последующей пайпель-биопсией эндометрия, гистологическим и иммуногистохимическим исследованием. Всем пациенткам были выполнены бактериоскопическое исследование отделяемого уретры, цервикального канала и влагалища, ПЦР-исследование на наличие бактериальных и вирусных инфекций, а также определение антигенов ВПЧ, ЦМВ и ВПГ методом световой микроскопии с помощью микроскопа «Axio Lab. A1» (Carl Zeiss, Германия) для исключения влияния на результаты исследования инфекционного компонента. Пациентки обеих групп были сопоставимы по возрасту, весу, анамнестическим факторам (менструальная функция, репродуктивная функция, наличие хронических соматических заболеваний). Критерии включения пациенток в исследование: наличие женского бесплодия, ассоциированного с ХЭ; наличие бесплодия, ассоциированного с мужским фактором, без признаков ХЭ. Критерии исключения: наличие бактериальных и вирусных инфекций мочеполовых путей, других инфекционных, аллергических, аутоиммунных, воспалительных, онкологических, психических заболеваний, получение гормональной, противовоспалительной терапии, наличие пороков развития половых органов. Клинико-диагностическая характеристика пациенток представлена в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика пациенток с бесплодием

Параметр	Значение параметров	Пациенты с ХЭ (n = 27)	Пациенты без ХЭ (n = 23)
Возраст, л (Me(Q ₁ -Q ₃))		40,0 (34,0-42,0)	34,0 (30,0-38,0)
Продолжительность бесплодия, л (Me(Q ₁ -Q ₃))		4,0 (2,0-6,0)	3,0 (2,0-5,0)
УЗИ признаки ХЭ, частота встречаемости, % (абс.ч.)	есть	59,3% (16)	0% (0)
	нет	40,7% (11)	100% (23)
ИГХ признаки ХЭ, частота встречаемости, % (абс.ч.)	есть	100% (27)	-
	нет	0% (0)	-
Наличие инфекционных заболеваний мочеполовых путей в анамнезе	есть	33,3% (9)	4,3% (1)
	нет	33,7% (18)	95,7% (22)

Оценка параметров системного воспалительного статуса, в том числе воспалительных индексов

Всем пациенткам было проведено количественное определение популяций лейкоцитов крови стандартным гематологическим методом с использованием гематологического анализатора (Abbott Laboratories, США).

На основе клеточного состава периферической крови рассчитывали следующие воспалительные индексы: NLR (neutrophil-lymphocyte ratio); PLR (platelet-lymphocyte ratio); MLR (monocyte-lymphocyte ratio); SII (systemic inflammatory index) [10-12].

Индексы рассчитывали по формулам:

NLR = абсолютное количество нейтрофилов / абсолютное количество лимфоцитов;

PLR = абсолютное количество тромбоцитов / абсолютное количество лимфоцитов;

MLR = абсолютное количество моноцитов / абсолютное количество лимфоцитов;

SII = абсолютное количество тромбоцитов — абсолютное количество нейтрофилов / абсолютное количество лимфоцитов.

Концентрацию СРБ в сыворотке крови пациентов определяли методом иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя с помощью набора «СРБ-ИФА» (ХЕМА, Россия) и рассчитывали в мг/мл.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ IBM SPSS Statistics 22 (Armonk; США) и GraphPad Prism 8.3.1 (GraphPad Software; США). Все исследуемые параметры были проверены на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Параметры описывали с помощью медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q₁-Q₃). Оценка различий параметров осуществляли при помощи критериев Манна-Уитни и Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (5%).

Для оценки диагностической значимости параметров системного воспалительного статуса при прогнозировании наличия ХЭ использовали ROC-анализ. Пороговое значение количественного признака в точке cut-off определяли по наивысшему значению индекса Юдена. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$ (5%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ таких параметров системного воспалительного статуса, как СОЭ, общего количества тромбоцитов, лейкоцитов, а также абсолютного и относительного количества лейкоцитарных популяций,

Таблица 2. Гематологические показатели системного воспаления у пациенток с бесплодием (Me (Q₁-Q₃))

Показатель	Пациентки с ХЭ (n = 27)	Пациентки без ХЭ (n = 23)	p
СОЭ, мм/ч	6,0 (3,0-15,0)	10,0 (2,0-15,0)	0,8879
СРБ, мг/л	2,25 (1,03-3,80)	0,60 (0,06-0,82)	0,0191
Абсолютное количество клеток, 10 ⁹ /л			
Тромбоциты	255,0 (226,0-287,0)	262,0 (235,0-297,0)	0,2633
Лейкоциты	5,7 (4,8-6,8)	6,0 (5,3-6,7)	0,7392
Нейтрофилы	3,4 (2,6-3,9)	3,1 (2,7-3,8)	0,7028
Лимфоциты	1,6 (1,4-2,2)	2,0 (1,7-2,4)	0,0451
Моноциты	0,50 (0,40-0,50)	0,40 (0,33-0,49)	0,0963
Эозинофилы	0,10 (0,10-0,20)	0,11 (0,07-0,17)	0,9635
Базофилы	0,00 (0,00-0,10)	0,02 (0,00-0,03)	0,8979
Относительное количество клеток, %			
Нейтрофилы	58,1 (54,1-61,9)	56,1 (49,5-59,3)	0,1012
Лимфоциты	29,5 (26,8-34,1)	36,0 (31,0-40,0)	0,0089
Моноциты	8,3 (7,1-9,7)	7,4 (5,5-8,4)	0,0469
Эозинофилы	2,1 (1,7-2,7)	2,1 (1,5-3,1)	0,7098
Базофилы	0,7 (0,5-1,0)	0,4 (0,1-0,5)	0,0005

Таблица 3. Параметры системного воспалительного статуса у пациенток с бесплодием (Me (Q₁-Q₃))

Показатель	Пациентки с ХЭ (n = 27)	Пациентки без ХЭ (n = 23)	p
Воспалительные индексы, абс. ед.			
NLR	1,93 (1,50–2,38)	1,55 (1,30–1,93)	0,0387
MLR	0,27 (0,23–0,30)	0,20 (0,14–0,27)	0,0058
PLR	148,7 (122,6–183,0)	126,8 (111,1–138,7)	0,0335
SII	469,9 (385,3–628,0)	396,4 (329,8–511,7)	0,0333

выявил статистически значимые различия между группами пациенток с наличием и отсутствием ХЭ (табл. 2). Так, у пациенток с бесплодием, ассоциированным с ХЭ, абсолютное и относительное количество лимфоцитов в крови было статистически значимо ниже по сравнению с пациентками без ХЭ ($p = 0,0451$ и $p = 0,0089$ соответственно). В то же время относительное количество моноцитов и базофилов в крови в основной группе статистически значимо превышало аналогичные параметры группы сравнения ($p = 0,0469$ и $p = 0,0005$ соответственно). Кроме того, у пациенток из исследуемой группы концентрация СРБ в крови была почти в 4 раза выше, чем у пациенток из группы сравнения ($p = 0,0191$) (табл. 2). Все показатели в обеих группах оставались в пределах референсных значений.

При сравнительном анализе гематологических воспалительных индексов у пациенток с бесплодием, ассоциированным с ХЭ, и пациенток без ХЭ также были обнаружены значимые межгрупповые различия. Так, у пациенток из исследуемой группы индексы NLR ($p = 0,0387$), MLR ($p = 0,0058$), PLR ($p = 0,0335$) и SII ($p = 0,0333$) были статистически значимо выше аналогичных показателей пациенток группы сравнения (табл. 3).

Для оценки диагностической значимости определения гематологических воспалительных индексов у пациенток для выявления наличия или отсутствия субклинического воспаления в эндометрии были проведены ROC-анализ и оптимальные пороговые значения рассматриваемых параметров.

Проведенный анализ показал значимую связь индексов NLR и MLR с наличием признаков хронического воспаления в эндометрии у пациенток с бесплодием. Так, с вероятностью наличия ХЭ у пациенток с бесплодием были ассоциированы величины NLR, превышающие пороговое значение 1,56 абс. ед. (табл. 4; рис. 1). Площадь под кривой составила 0,871 (95% ДИ: 0,767–0,974), чувствительность — 87,0%, специфичность — 73,7%. Полученная модель была статистически значимой ($p < 0,0001$).

Аналогичная связь была обнаружена и для индекса MLR. ROC-анализ показал, что значения индекса MLR, превышающие 0,24 абс. ед., являются независимым и неблагоприятным признаком высокого риска обнаружения ХЭ у пациенток с бесплодием (табл. 4; рис. 2). Площадь под кривой составила 0,848 (95% ДИ: 0,737–0,958), чувствительность — 80,0%, специфичность — 75,0%. Полученная модель была статистически значимой ($p < 0,0001$).

Таблица 4. Характеристика предиктивной значимости воспалительных гематологических индексов для выявления наличия хронического воспаления эндометрия у пациенток с бесплодием

Показатель	cut-off	AUC	95% ДИ	p	Чувствительность, %	Специфичность, %
NLR	1,56	0,871	0,767–0,974	< 0,0001	87	73,7
MLR	0,24	0,848	0,737–0,958	< 0,0001	80	75
PLR	130,4	0,679	0,528–0,831	0,0339	61,5	54,6
SII	469	0,683	0,531–0,837	0,0333	52	61,9

При оценке диагностической значимости индексов PLR и SII не было выявлено значимой связи их величины с наличием хронического воспаления в эндометрии ($p > 0,05$) (табл. 4). Кроме того, не было установлено диагностической значимости величины таких клеточных параметров системного воспалительного статуса, как общее количество тромбоцитов, лейкоцитов, абсолютное и относительное количество различных лейкоцитарных популяций, а также СОЭ и СРБ ($p > 0,05$) для выявления ХЭ у пациенток с бесплодием.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Воспаление играет ведущую роль в патогенезе эндометрит-ассоциированного бесплодия и связано с риском неблагоприятных репродуктивных событий. Показано, что воспаление может снижать экспрессию рецепторов эстрогена и прогестерона в эндометрии, что вызывает задержку его созревания и негативно сказывается на успешности имплантации эмбриона [13].

Диагностика ХЭ имеет ряд сложностей, обусловленных часто бессимптомным течением заболевания, недостаточной эффективностью ультразвукового исследования и отсутствием единых диагностических критериев. Отсутствие УЗИ-признаков ХЭ не исключает наличия воспалительного процесса в эндометрии и требует проведения инвазивной и дорогостоящей процедуры — аспирационной биопсии для патоморфологического подтверждения диагноза [14].

В последнее время в качестве новых биомаркеров при различных социально значимых заболеваниях, сопровождающихся воспалительной реакцией с субклиническим течением, предлагают использовать гематологические воспалительные индексы. Так имеются данные о пользе этих показателей в прогнозе сердечно-сосудистых [15], онкологических [16], психических [17] заболеваний, а также системных воспалительных заболеваний соединительной ткани [18]. Среди достоинств этих показателей стоит отметить их неинвазивность, доступность и простоту определения, а также низкую стоимость.

В контексте незлокачественных гинекологических патологий диагностическая и предиктивная значимость гематологических воспалительных индексов практически не изучена. Последние исследования в области акушерства и гинекологии продемонстрировали их пользу

при эндометриозе, синдроме гиперстимуляции яичников, а также неблагоприятном течении и осложнениях беременности (в частности, при преэклампсии) [8]. Данные о роли вышеуказанных гематологических воспалительных индексов при ХЭ в отечественных и зарубежных источниках в настоящее время отсутствуют. Таким образом, целесообразно дальнейшее изучение их прогностической значимости у пациенток с хроническими воспалительными заболеваниями эндометрия, особенно при лечении бесплодия с помощью вспомогательных репродуктивных технологий.

Клиническое значение гематологических клеточных и молекулярных показателей при хроническом субклиническом течении воспалительного процесса невелико. Так, несмотря на обнаруженные нами статистически значимые различия в количестве лимфоцитов, моноцитов и базофилов, а также концентрации СРБ между группами больных бесплодием, ассоциированным с ХЭ, и без такового, все эти показатели оказались неинформативны, поскольку оставались в пределах референсных значений.

При этом величина воспалительных гематологических индексов NLR, PLR, MLR и SII в этих группах статистически значимо отличалась (табл. 3), а для NLR и MLR была установлена диагностическая значимость (табл. 4, рис. 1 и 2). NLR отражает баланс врожденного и адаптивного иммунного ответа при действии различных стрессоров. Величина NLR характеризует выраженность системной воспалительной реакции [19]. Его повышение у пациентов с бесплодием, ассоциированным с ХЭ, может быть результатом уменьшения в крови количества лимфоцитов вследствие их постоянного рекрутирования в очаг хронического воспаления. Снижение значения NLR, вероятно, может свидетельствовать о затухании или исчезновении воспалительной реакции и является благоприятным прогностическим признаком. MLR отражает соотношение моноцитов и лимфоцитов в крови. Моноциты циркулируют в крови не долго и мигрируют в ткани, пополняя пул тканевых макрофагов. Кроме того, они могут дифференцироваться в дендритные клетки и тканеспецифичные фагоциты [20]. Моноциты/макрофаги осуществляют фагоцитоз и удаление поврежденных клеток, процессинг антигенов, стимуляцию Т- и В-клеточного иммунного ответа, а также секретируют регуляторные и эффекторные цитокины, которые обеспечивают развитие системного воспалительного ответа [21]. Высокое значение MLR у больных бесплодием, ассоциированным с ХЭ, вероятно, обусловлено, с одной стороны, недостаточной скоростью миграции моноцитов из крови в очаг хронического воспаления, а с другой стороны, как уже было сказано выше, перераспределением лимфоцитов между кровью и воспаленным эндометрием. В пользу данной теории свидетельствует обнаруженное нами снижение количества лимфоцитов и увеличение количества моноцитов в крови у больных с ХЭ (табл. 2).

Для внедрения воспалительных гематологических индексов в лабораторную и клиническую практику требуется дальнейшая валидация дискриминационных уровней данных показателей в независимой выборке пациенток, страдающих разными формами бесплодия. Однако уже сейчас можно утверждать, что индексы NLR и MLR могут быть использованы при лечении женщин с бесплодием для выявления пациенток с бессимптомным ХЭ даже при наличии у них нормальных гематологических показателей и отсутствии УЗИ-признаков воспалительного процесса. Таким пациенткам целесообразно проведение

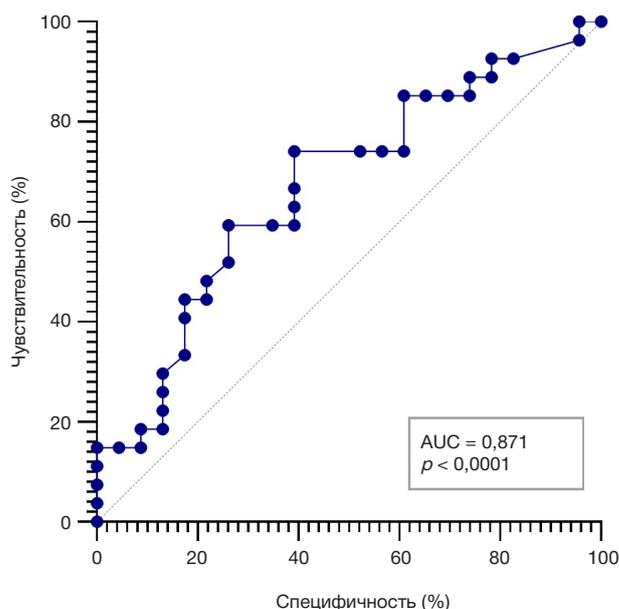


Рис. 1. ROC-кривая предиктивной значимости величины индекса NLR для выявления наличия хронического эндометрита у пациенток с бесплодием

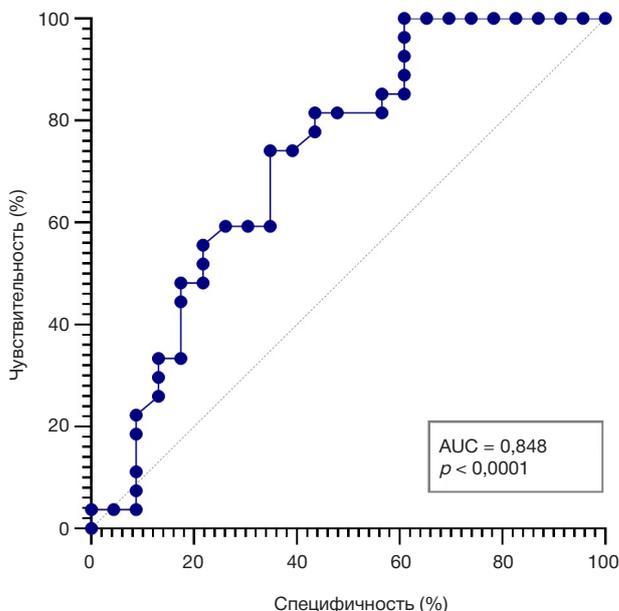


Рис. 2. ROC-кривая предиктивной значимости величины индекса MLR для выявления наличия хронического эндометрита у пациенток с бесплодием

дальнейшего иммуногистохимического исследования эндометрия для подтверждения диагноза и назначения противовоспалительной терапии перед проведением ЭКО.

ВЫВОДЫ

У пациенток с бесплодием, ассоциированным с хроническим воспалением эндометрия, отмечались более высокие относительное количество моноцитов и базофилов, и более низкое абсолютное и относительное количество лимфоцитов, чем у пациенток без признаков хронического эндометрита, однако данные показатели оставались в пределах нормальных значений. Сравнительный анализ гематологических воспалительных индексов показал статистически значимое повышение их величины при бесплодии, ассоциированном с ХЭ. Однако ROC-анализ позволил установить, что только

индексы NLR и MLR могут быть использованы в качестве предикторов ХЭ у пациенток с бесплодием, когда другие воспалительные маркеры остаются в пределах нормальных значений. Поводя итог, следует отметить, что несмотря на нормальные гематологические клеточные показатели и отсутствие УЗИ-признаков эндометрита, у пациенток с бесплодием нельзя исключить наличие хронического субклинического воспалительного процесса эндометрия без определения индексов NLR и MLR.

Данные маркеры могут быть полезны в клинической практике для скрининга пациенток, направленных на проведение ЭКО. Оценка указанных индексов позволит стратифицировать пациенток в группу высокого риска наличия бессимптомного хронического эндометрита и направить их на дальнейшее иммуногистохимическое исследование и, при необходимости, соответствующее лечение перед проведением ЭКО, что поможет снизить риски его неудачи.

Литература

1. Клинические рекомендации. Воспалительные болезни женских тазовых органов. 2024-2025-2026 (24.09.2024). Утверждены Минздравом РФ. 28 с.
2. Singh N, Sethi A. Endometritis — Diagnosis, Treatment and its impact on fertility — A Scoping Review. *JBRA Assisted Reproduction*. 2022; 26 (3): 538–46.
3. Колмык В. А., Насыров Р. А., Кутушева Г. Ф., Петров В. В., Григорьев С. Г. Значение иммуногистохимического контроля для лечения пациенток с хроническим эндометритом. *Педиатрия*. 2016; 7 (3): 17–22.
4. Суханов А. А., Дикке Г. Б., Кукарская И. И. Эпидемиология женского бесплодия и опыт восстановления репродуктивной функции у пациенток с хроническим эндометритом в Тюменском регионе. *Проблемы репродукции*. 2023; 29 (3): 98–107.
5. Конопля А. А., Гавриш С. А., Конопля А. И., Локтионов А. Л. Применение внутривенного лазерного облучения крови в коррекции иммунных нарушений у пациенток с хроническим эндометритом. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2016; 5: 19–22.
6. Трунова Л. А., Трунов А. Н., Маринкин И. О., Кулешов В. М., Обухова О. О., Горбенко О. М. и др. Дисбаланс цитокинов и активность иммуновоспалительного процесса у женщин с бесплодием. *Аллергология и иммунология*. 2014; 15 (1): 22–25.
7. Kimura F, Takebayashi A, Ishida M, Nakamura A, Kitazawa J, Morimuneet A, et al. Review: Chronic endometritis and its effect on reproduction. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019; 45 (5): 951–60.
8. Иванов Д. О., Криволезова Т. А., Сигарева Л. П., Резник В. А., Савельева О. Е. Прогностический потенциал воспалительных гематологических индексов при экстракорпоральном оплодотворении. *Педиатрия*. 2025; 16 (1): 88–99.
9. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Noda E, Ohtani H, Nishiguchi Y, et al. A high preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with poor survival in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2013; 33: 3291–4.
10. Yodying H, Matsuda A, Miyashita M, Matsumoto S, Sakurazawa N, Yamada M, et al. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Oncologic Outcomes of Esophageal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23: 646–54.
11. Naess A, Nilssen SS, Mo R, Eide GE, Sjursen H. Role of neutrophil to lymphocyte and monocyte to lymphocyte ratios in the diagnosis of bacterial infection in patients with fever. *Infection*. 2017; 45 (3): 299–307.
12. Xu T, Zhang S-M, Wu H-M, Wen X-M, Qiu D-Q, et al. Prognostic significance of prognostic nutritional index and systemic immune-inflammation index in patients after curative breast cancer resection: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2022; 22 (1): 1128.
13. Mishra K, Wadhwa N, Guleria K, Agarwal S. ER, PR and Ki-67 expression status in granulomatous and chronic non-specific endometritis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008; 34(3): 371–378.
14. Савельева О. Е., Криволезова Т. А., Сигарева Л. П., Шляхова А. Д., Гурина О. П., Резник В. А. Локальный и системный иммунный статус женщин с бесплодием, ассоциированным с хроническим эндометритом. *Педиатрия*. 2025; 16 (2): 56–65.
15. Тополянская С. В., Елисеева Т. А., Турна О. И., Вакуленко О. Н., Бубман Л. И., Романова М. А. и др. Гематологические индексы — возможный маркер субклинического воспаления у больных ишемической болезнью сердца старческого возраста и долгожителей. *Клинический разбор в общей медицине*. 2022; 6: 6–13.
16. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S, Kimura K, et al. The prognostic significance of the advanced lung cancer inflammation index in patients with unresectable metastatic colorectal cancer: A retrospective study. *BMC Cancer*. 2019; 19: 241.
17. Горбунова А. П., Рукавишников Г. В., Касьянов Е. Д., Мазо Г. Э. Роль гематологических коэффициентов системного воспаления в диагностике и оценке риска аффективных расстройств. *Обзор психиатрии и медицинской психологии им. В. М. Бехтерева*. 2024; 58 (1): 47–55.
18. Манзюк А. В., Морозова Т. Е., Герцог А. А., Литвинова М. А. Прогностическая ценность гематологических индексов при системных воспалительных заболеваниях соединительной ткани. *Медицинский совет*. 2024; 18 (12): 136–42.
19. Lowsby R, Gomes C, Jarman I, Lisboa P, Nee PA, Vardhan M, et al. Neutrophil to lymphocyte count ratio as an early indicator of blood stream infection in the emergency department. *Emerg Med J*. 2015; 32: 531–4.
20. Dalton HJ, Armaiz-Pena G, Gonzalez-Villasana V, Lopez-Berestein G, Bar-Eli M, Sood AK. Monocyte Subpopulations in Angiogenesis. *Cancer Res*. 2014; 74 (5): 1287–93.
21. Титов Л. П. Моноциты, макрофаги и дендритные клетки: генез, классификация, иммунобиологические свойства. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2018; 15 (3): 363–82.

References

1. Klinicheskie rekomendacii. Vospalitel'ny'e bolezni zhenskix tazovyx organov. 2024-2025-2026 (24.09.2024). Utverzhdeny Minzdravom RF. 28 s. Russian.
2. Singh N, Sethi A. Endometritis — Diagnosis, Treatment and its impact on fertility — A Scoping Review. *JBRA Assisted Reproduction*. 2022; 26 (3): 538–46.
3. Kolmyk VA, Nasyrov RA, Kutusheva GF, Petrov VV, Grigoryev SG. Immunohistochemical value to treat patients with chronic endometritis. *Pediatrician (St Petersburg)*, 2016; 7 (3): 17–22. Russian.
4. Sukhanov AA, Dikke GB, Kukarskaya II. Epidemiology of female infertility and the experience of recovery of reproductive function in patients with chronic endometritis in the tyumen region. *Russian Journal of Human Reproduction*. 2023; 29 (3): 98–07. Russian.
5. Konoplya AA, Gavriush SA, Konoplya AI, Loktionov AL. The application of intravascular laser irradiation of blood for the correction of the immune disturbances in patients presenting with chronic endometritis. *Problems of Balneology, Physiotherapy and Exercise Therapy*. 2016; 93 (5): 19–22. Russian.

6. Trunova LA, Trunov AN, Marinkin IO, Kuleshov VM, Obuxova OO, Gorbenko OM i dr. Disbalans citokinov i aktivnost' immunovospalitel'nogo processa u zhenshhin s besplodiem. *Allergologiya i immunologiya*. 2014; 15 (1): 22–25. Russian.
7. Kimura F, Takebayashi A, Ishida M, Nakamura A, Kitazawa J, Morimuneet A, et al. Review: Chronic endometritis and its effect on reproduction. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019; 45 (5): 951–60.
8. Ivanov DO, Krivolesova TA, Sigareva LP, Reznik VA, Savelieva OE. Prognostic potential of hematological inflammatory indexes for in vitro fertilization. *Pediatrician (St. Petersburg)*. 2025; 16 (1): 88–99. Russian.
9. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Noda E, Ohtani H, Nishiguchi Y, et al. A high preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with poor survival in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2013; 33: 3291–4.
10. Yodying H, Matsuda A, Miyashita M, Matsumoto S, Sakurazawa N, Yamada M, et al. Prognostic Significance of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Platelet-to-Lymphocyte Ratio in Oncologic Outcomes of Esophageal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Surg Oncol*. 2016; 23: 646–54.
11. Naess A, Nilssen SS, Mo R, Eide GE, Sjursen H. Role of neutrophil to lymphocyte and monocyte to lymphocyte ratios in the diagnosis of bacterial infection in patients with fever. *Infection*. 2017; 45 (3): 299–307.
12. Xu T, Zhang S-M, Wu H-M, Wen X-M, Qiu D-Q, et al. Prognostic significance of prognostic nutritional index and systemic immune-inflammation index in patients after curative breast cancer resection: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2022; 22 (1): 1128.
13. Mishra K, Wadhwa N, Guleria K, Agarwal S. ER, PR and Ki-67 expression status in granulomatous and chronic non-specific endometritis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2008; 34(3): 371–378.
14. Savelieva OE, Krivolesova TA, Sigareva LP, Shlyakhova AD, Gurina OP, Reznik VA. Local and systemic immune status of women with infertility associated with chronic endometritis. *Pediatrician (St. Petersburg)*. 2025; 16 (2): 56–65. Russian.
15. Topolyanskaya SV, Eliseeva TA, Turna OI, Vakulenko ON, Bubman LI, Romanova MA, et al. Hematological indices — a possible marker of subclinical inflammation in very elderly patients and centenarians. *Clinical review for general practice*. 2022; 6: 6–13. Russian.
16. Shibutani M, Maeda K, Nagahara H, Fukuoka T, Matsutani S, Kimura K, et al. The prognostic significance of the advanced lung cancer inflammation index in patients with unresectable metastatic colorectal cancer: A retrospective study. *BMC Cancer*. 2019; 19: 241.
17. Gorbunova AP, Rukavishnikov GV, Kasyanov ED, Mazo GE. The role of hematological coefficients of systemic inflammation in the diagnosis and risk assessment of affective disorders. *V. M. Bekhterev Review of psychiatry and medical psychology*. 2024; 58 (1): 47–55. Russian.
18. Manzyuk AV, Morozova TE, Gertsog AA, Litvinova MA. The prognostic value of hematological indices in systemic inflammatory diseases of connective tissue. *Meditinskiy sovet*. 2024; 12: 136–42. Russian.
19. Lowsby R, Gomes C, Jarman I, Lisboa P, Nee PA, Vardhan M, et al. Neutrophil to lymphocyte count ratio as an early indicator of blood stream infection in the emergency department. *Emerg Med J*. 2015; 32: 531–4.
20. Dalton HJ, Armaiz-Pena G, Gonzalez-Villasana V, Lopez-Berestein G, Bar-Eli M, Sood AK. Monocyte Subpopulations in Angiogenesis. *Cancer Res*. 2014; 74 (5): 1287–93.
21. Titov LP. Monocytes, macrophages, dendritic and myeloid suppressor cells: genesis, classification, immunobiological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Medical series*. 2018; 15 (3): 363–82.

КОЛИЧЕСТВО КОПИЙ РИБОСОМНЫХ ГЕНОВ В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ И ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТЬЮ

Е. С. Ершова¹, Н. Н. Вейко¹, Э. В. Костюк², А. А. Полеткина³, Т. М. Рожнова⁶, Н. В. Низяева⁵ , Д. У. Музаффаров², П. А. Клименко⁴, С. В. Костюк¹

¹ Институт биологии старения и медицины здорового долголетия с клиникой превентивной медицины, Российский научный центр хирургии имени Б. В. Петровского, Москва, Россия

² Институт общей и неорганической химии имени Н. С. Курнакова, Москва, Россия

³ Институт иммунологии, Федеральное медико-биологическое агентство, Москва, Россия

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени А. П. Авцина, Российский научный центр хирургии имени Б. В. Петровского, Москва, Россия

⁶ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова, Москва, Россия

Беременность требует от клеток организма женщины повышенного уровня биогенеза рибосом для увеличения интенсивности синтеза белка. Количество рибосом зависит от числа копий рибосомных генов в геноме (ЧК рДНК). Целью исследования было проверить гипотезу об ассоциации ЧК рДНК в геноме женщины с протеканием нормальной и осложненной беременности. Выборка 488 беременных (25–39 недель) включала группы: 1) беременность без патологии (контроль); 2) нарушение маточно-плацентарного кровотока и фетоплацентарная недостаточность; 3) врожденные пороки развития; 4) истмико-цервикальная недостаточность; 5) преждевременное созревание плаценты; 6) дихориальная диамниотическая двойня; 7) многоводие; 8) крупный плод. ЧК рДНК определяли методом количественной гибридизации в ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови. ЧК рДНК варьировало от 226 до 800 ($n = 488$). В группах 3–8 отсутствовали образцы ДНК с ЧК рДНК менее 290. Группы 5–8 не содержали образцов с ЧК рДНК более 520 и суммарно отличались от группы 1 низкими значениями ЧК рДНК (средние значения 360–381 для групп 3–8 и 452 для группы 1; $p < 10^{-7}$). Диапазон ЧК рДНК от 290 до 520 в геноме женщины (адаптивная норма, характерная для долгожителей) является оптимальным с точки зрения успешного завершения беременности при наличии осложнений. Низкое ЧК рДНК (200–290) в геноме ассоциировано с невозможностью реализации эмбриогенеза при наличии патологии/особенности плода. Большое содержание рДНК (более 600 копий) указывает на наличие в геноме женщины генетических вариантов, которые могут препятствовать протеканию осложненной беременности. Определение ЧК рДНК в геноме супружеских пар может быть полезным для планирования и прогнозирования течения беременности.

Ключевые слова: беременность, патология беременности, рибосомные гены, рДНК

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания: по теме «Молекулярные механизмы нарушений межклеточных взаимодействий при атипичной плацентации, пролиферативных заболеваниях органов репродуктивной системы и опухолевом росте» № 123030700104-3 FURG-2023-0049

Вклад авторов: Е. С. Ершова — экспериментальная работа, написание статьи; Н. Н. Вейко, С. В. Костюк — идея исследования, написание статьи; Э. В. Костюк — сбор биологического материала, описание патологии; А. А. Полеткина — сбор материала, экспериментальная работа; Т. М. Рожнова — статистическая обработка данных; Д. У. Музаффаров — экспериментальная работа; Н. В. Низяева — идея исследования, редактирование статьи; П. А. Клименко — классификация материала, описание патологии.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 228 от 17 апреля 2023 г.). Все участницы исследования подписали добровольное информированное согласие.

 **Для корреспонденции:** Наталья Викторовна Низяева
Абрикосовский переулок, д. 2, к. 1, г. Москва, 119435, Россия; nizyeva@gmail.com

Статья получена: 23.10.2025 **Статья принята к печати:** 28.11.2025 **Опубликована онлайн:** 12.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.075

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/>).

RIBOSOMAL GENE COPY NUMBER IN PERIPHERAL LEUKOCYTES OF WOMEN WITH NORMAL AND COMPLICATED PREGNANCY

Ershova ES¹, Veiko NN¹, Kostyuk EV², Poletkina AA³, Rozhnova TM⁶, Nizyeva NV⁵ , Muzaffarov DU², Klimenko PA⁴, Kostyuk SV¹

¹ Longevity Institute, Petrovsky Russian Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

² Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Moscow, Russia

³ Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁵ Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky Russian Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

⁶ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Pregnancy requires the cells of the woman's body to ensure increased ribosomal biogenesis in order to enhance the protein synthesis intensity. The number of ribosomes depends on the copy number of ribosomal genes (rDNA) in the genome. The study aimed to test the hypothesis about the association of the rDNA copy number in the woman's genome with the course of normal and complicated pregnancy. The sample of 488 pregnant women (25–39 weeks) included the following groups: 1) normal pregnancy (control); 2) impaired uteroplacental blood flow and fetoplacental insufficiency; 3) congenital malformations; 4) isthmic-cervical insufficiency; 5) early placental maturation; 6) dichorionic diamniotic twins; 7) polyhydramnios; 8) macrosomia. The rDNA copy number was determined by the quantitative hybridization method in the DNA extracted from peripheral leukocytes. The rDNA copy number varied between 226 and 800 ($n = 488$). DNA samples with the rDNA copy number below 290 were lacking in groups 3–8. Groups 5–8 included no samples with the rDNA copy number exceeding 520; these in total differed from group 1 by low rDNA copy number values (the average values were 360–381 for groups 3–8 and 452 for group 1; $p < 10^{-7}$). The rDNA copy number range of 290–520 in the woman's genome (the adaptive norm typical for long-lived individuals) is optimal in terms of successful completion of pregnancy in the presence of pregnancy complications. The low rDNA copy number (200–290) in the genome is associated with the failure to complete embryogenesis when there are some fetal abnormalities/features. A high rDNA content (over 600 copies) indicates the presence of genetic variants in the woman's genome that can interfere with the complicated pregnancy course. Determining the rDNA copy number in the genome of married couples may be useful for planning and predicting the course of pregnancy.

Keywords: pregnancy, pregnancy pathology, ribosomal genes, rDNA

Funding: the study was conducted under the State Task on the topic "Molecular mechanisms of abnormal cell-cell communication in atypical placentation, proliferative diseases of the reproductive system, and tumor growth" No. 123030700104-3 FURG-2023-0049.

Author contribution: Ershova ES — experimental procedure, manuscript writing; Veiko NN, Kostyuk SV — study concept, manuscript writing; Kostyuk EV — biomaterial collection, describing the disorder; Poletkina AA — material collection, experimental procedure; Rozhnova TM — statistical data processing; Muzaffarov DU — experimental procedure; Nizyeva NV — study concept, manuscript editing; Klimenko PA — classification of material, describing the disorder.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 228 dated 17 April 2023). The informed consent was submitted by all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Natalia V. Nizyeva
Abrikosovskiy pereulok, 2, k. 1, Moscow, 119435, Russia; nizyeva@gmail.com

Received: 23.10.2025 **Accepted:** 28.11.2025 **Published online:** 12.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.075

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/>).

Исследование влияния генетических особенностей матери на репродуктивную функцию и на процессы эмбриогенеза имеет большое значение для решения проблемы увеличения рождаемости. Беременность и роды требуют от клеток организма женщины способности эффективно отвечать на стресс и способности значительно увеличивать синтез белка в организме. Синтез белка — это центральное событие в функционировании эукариотической клетки, в том числе в ответ на стресс любой природы. Этот процесс, называемый трансляцией, осуществляется особыми молекулярными машинами — рибосомами. Рибосома человека состоит из двух компонентов — рибосомной РНК (рРНК) и 70–80 рибосомных белков [1]. Гены 28S, 5,8S и 18S рРНК (рДНК) в геноме человека представлены множественными копиями. Копии рДНК организованы в тандемные повторы длиной 43 т.п.н. на пяти парах акроцентрических хромосом. Каждая

единица повтора включает транскрибируемую область длиной 13,3 т.п.н. (47S рРНК), содержащую гены 28S, 5,8S, 18S рРНК, транскрибируемые спейсеры (5'ETS и 3'ETS) и нетранскрибируемый межгенный спейсер (IGS). Вместе с копиями 5S рРНК (гены расположены на первой хромосоме) эти рРНК формируют рибосомы [2]. Основная функция рибосомных повторов — это синтез рРНК для рибосом. Транскрипция рДНК осуществляется РНК-полимеразой I в особой клеточной структуре в составе ядра — в ядрышке (рис. 1А).

Геном человека содержит приблизительно от 200 до 1000 копий тандемных рибосомных повторов [3–5]. Число копий рДНК в геноме клеток различного типа одного организма постоянно и не изменяется с возрастом или в условиях стресса. Число копий рДНК одинаково также в составе одной клеточной популяции. Иными словами, число копий рДНК можно отнести к стабильным генетическим

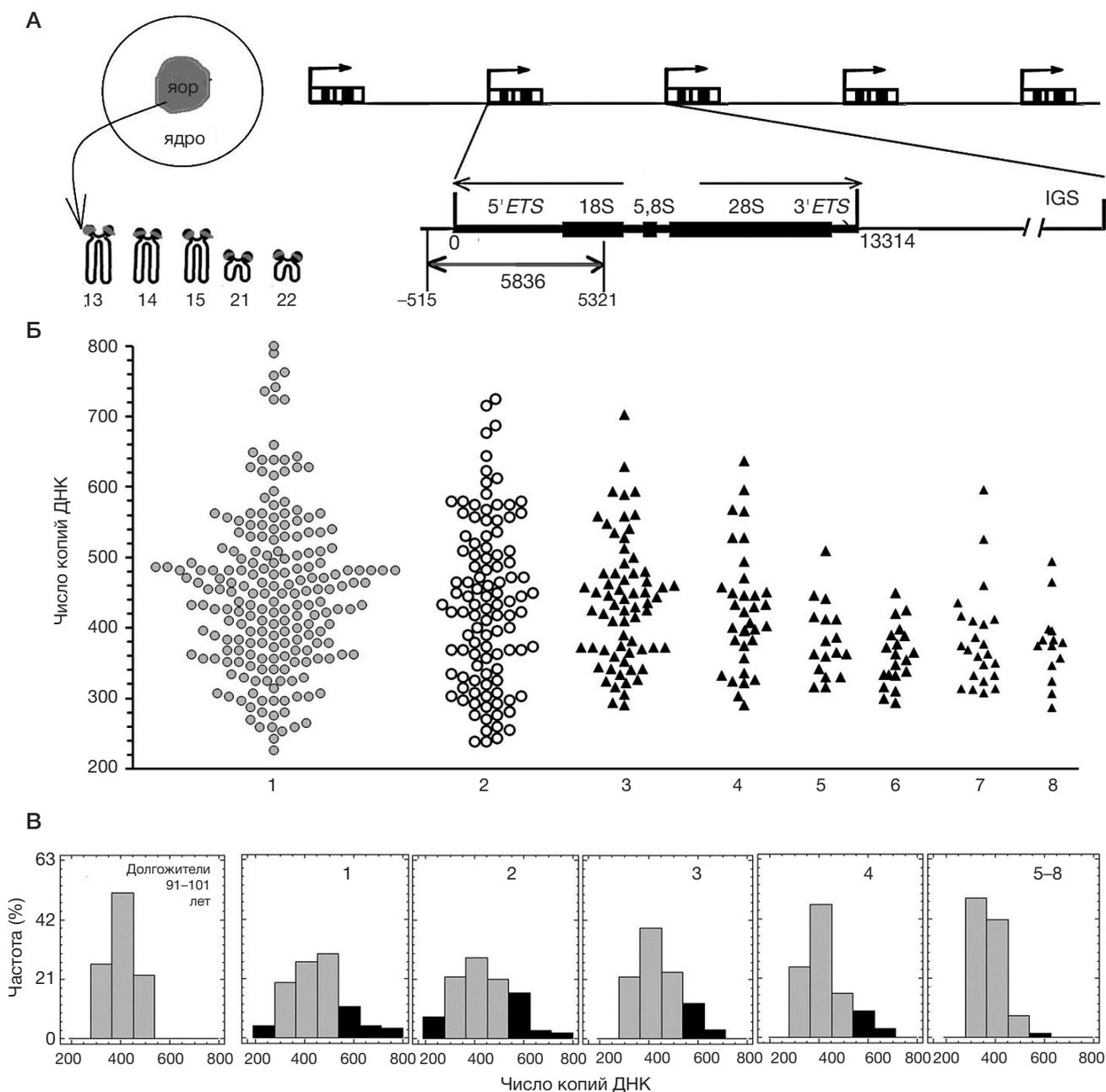


Рис. 1. Вариация числа копий рибосомного повтора в геномах беременных женщин. **А.** Схема рибосомного повтора. Показан участок повтора, определяемый ДНК-зондом методом гибридизации. **Б.** Экспериментальные данные, отражающие содержание повтора рДНК в исследуемых группах. **В.** Распределения образцов ДНК в группах по числу копий рДНК в геноме

Таблица 1. Описание групп женщин, для которых определили число копий рДНК. Приводятся данные описательной статистики

№	Группа	N	Среднее ± SD	I min-max	CI (95%)	Медиана	Квар
1	Контроль (беременность норма)	207	452 ± 113	226–800	436–467	450	0,25
2	Нарушение маточно-плацентарного кровотока и фетоплацентарная недостаточность	107	436 ± 115	237–724	413–457	432	0,26
3	Врожденные пороки развития, х.а.	66	436 ± 88	290–702	414–459	434	0,2
4	Истмико-цервикальная недостаточность	34	423 ± 88	290–637	395–459	415	0,21
5	Преждевременное созревание плаценты	17	381 ± 53	316–509	356–416	365	0,14
6	Дихориальная диамниотическая двойня	20	360 ± 43	294–449	338–382	358	0,12
7	Многоводие	23	379 ± 74	289–596	348–415	363	0,19
8	Крупный плод	14	375 ± 57	287–494	332–415	374	0,15
Д	Долгожители (91–101 год) [3]	103	404 ± 55	290–519	393–414	403	0,13

признакам, которые не изменяются на протяжении жизни человека [3]. В последние годы появляется все больше работ, указывающих на роль количества копий рДНК в геноме в функционировании организма человека и на ассоциацию этого признака с патологией и старением. Показано, что число копий рДНК ассоциировано с уровнем хронического воспаления и заболеванием почек [6], с массой тела [7], а также с наличием моногенной патологии (муковисцидоз) или полигенной патологии (шизофрения) [3]. Малое число копий рДНК ассоциировано с развитием когнитивных нарушений в пожилом возрасте [8], с более замедленным метаболизмом и с низкой устойчивостью клеток человека к стрессу [7, 9]. Содержание рДНК в клетках крови долгожителей варьирует в узком диапазоне значений — приблизительно от 290 до 530 копий. До возраста 90 лет и старше не доживают люди с более низкими или более высокими значениями числа копий рДНК в геноме [10].

В ядрышке транскрибируется примерно треть всех копий рДНК, которые называют активными копиями. Эти копии не метилированы, в отличие от транскрипционно неактивных копий, в которых метилирована транскрибируемая область рДНК. Количество активных копий рДНК пропорционально общему числу копий в геноме [11]. Приводятся данные, согласующиеся с гипотезой о существовании стабилизирующего отбора, действующего на уровне зигот и/или раннего эмбриогенеза и направленного на поддержание количества активных копий рДНК в интервале от ~94 до ~277 копий (за пределами указанных пороговых значений клетка нежизнеспособна). Определена величина зиготических потерь по данному признаку (примерно 10%) [11, 12]. Полученные данные позволяют предположить, что потери зигот/эмбрионов при недостатке или избытке активных копий рибосомных генов в геноме могут быть одним из факторов, определяющих сниженную плодовитость у некоторых супружеских пар [13].

Влияние числа копий рДНК в геноме женщины на репродуктивную функцию и на процесс эмбриогенеза пока изучено недостаточно. В литературе есть только данные авторов, которые выявили положительную ассоциацию между успешностью ЭКО и количеством копий рДНК в лейкоцитах женщин [14]. Показано также, что замершая беременность ассоциирована с выраженным дисбалансом по содержанию рДНК в геноме эмбриона и геноме матери. В большинстве случаев геном неразвивающегося эмбриона содержит достоверно меньше копий рДНК, чем геном матери и геномы других эмбрионов, развитие которых не прерывалось самопроизвольно [15].

Следует отметить, что широко применяемый в практике анализа генов метод количественной ПЦР мало применим

к анализу многокопийных рибосомных повторов в силу ряда причин, которые подробно рассмотрены ранее [16]. Тандемный характер повторов, большое количество самокомплментарных участков, различный уровень метилирования копий, повышенная окислительная модификация множественных Gp-богатых участков рДНК приводят к тому, что рДНК является очень плохой матрицей для Taq-полимеразы. Мы наблюдали нелинейную зависимость эффективности реакции амплификации от концентрации и уровня окисления рДНК, в отличие от других последовательностей генома. Специально для количественного анализа рДНК был разработан метод нерадиоактивной количественной гибридизации (NQН), который не зависит от уровня метилирования, окисления и фрагментации ДНК, поскольку не предполагает использования ПЦР. Денатурированные щелочью фрагменты ДНК, иммобилизованные на фильтре, гибридизуются с длинным ДНК-зондом, меченным биотином. Несколько калибровочных образцов ДНК с известным содержанием рибосомного повтора используют в качестве стандартов. Результаты, полученные с помощью NQН при исследовании рДНК в выборке здоровых доноров, полностью подтвердились более поздними исследованиями авторов, применивших новый метод анализа длинных фрагментов ДНК, не предполагающий использование реакции амплификации (Оксфордская нанопора [17]).

Целью нашего исследования было оценить связь между числом копий рибосомных генов в геноме матери и риском развития различных осложнений беременности. Для этого мы определили число копий рДНК методом NQН в геномах лейкоцитов женщин с нормально протекающей беременностью и беременностью с осложнениями/особенностями, которые вызваны различными причинами.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Образцы крови женщин с нормально протекающей беременностью и с осложненной беременностью были получены в рамках совместной работы с Кафедрой акушерства и гинекологии педиатрического факультета ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова.

Образцы венозной крови для анализа количества копий рДНК в лейкоцитах были взяты у 488 беременных женщин в возрасте 18–45 лет (средний возраст 32 ± 5 лет, срок гестации 25–39 недель), проживающих в г. Москве (РФ) в одинаковых социальных условиях. Кроме того, для сравнения были взяты опубликованные ранее данные, отражающие содержание рДНК в геномах долгожителей ($n = 103$, женщин 84%) возраста 91–101 год [3]. Были сформированы группы 1–8 (табл. 1).

Критерии включения: группа 1 (контрольная группа) — женщины с нормально протекающей беременностью без какой-либо выявленной патологии, родившие здоровых детей без признаков гипоксии и гипотрофии; группы 2–8 — женщины с проблемной беременностью, с диагнозами, указанными в табл. 1.

Критерии исключения: наличие у пациента хронических заболеваний (диабет, аутоиммунные болезни, сердечно-сосудистые, онкологические) и наследственной патологии; наличие острых инфекций на момент забора крови; табакокурение, употребление алкоголя, прием наркотических веществ или лекарств; предыдущие неудачные беременности.

Специальные исследования

Выделение ДНК из 1 мл крови проводили методом фенольной экстракции. Эритроциты крови лизировали (0,25% хлорид аммония), лейкоциты осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин, к осадку добавляли 1 мл лизирующего буфера (1% лаурилсаркозилат натрия, 0,02 M EDTA, pH 7) и обрабатывали РНКазой А с концентрацией 0,075 мг/мл (Sigma; США) в течение 45 мин (37 °C). Далее смесь обрабатывали протеиназой К 0,2 мг/мл (Promega; США) в течение 24 ч при 37 °C. После двух циклов экстракции с насыщенным фенольным раствором ДНК осаждали добавлением двух объемов этанола в присутствии 2 M ацетата аммония. Затем осадок дважды промывали 75%-м этанолом, высушивали и растворяли в воде.

Этап определения концентрации ДНК в образце является критичным для анализа. Концентрацию определяли двумя методами — спектрофотометрическим (регистрировали спектр поглощения на приборе Shimadzu UV-160A) и флуориметрическим. Использовали флуоресцирующий краситель PicoGreen (Sigma; США). Флуоресценцию регистрировали на приборе LS-55 (Perkin Elmer; США).

Для определения числа копий рибосомного повтора в составе ДНК, выделенной из крови, применяли метод нерадиоактивной количественной дот-гибридизации с биотинированными ДНК-зондами, который подробно описан ранее [16]. Денатурированные 0,1M NaOH пробы ДНК, набор калибровочных образцов ДНК с известным содержанием рДНК и отрицательный контроль на неспецифическое связывание наносили в одинаковом количестве (20 нг) в нескольких повторах на нитроцеллюлозные фильтры и после температурной иммобилизации инкубировали с биотинированным ДНК-зондом (рис. 1А). Зонд р(5'ETS-18S) — клонированный в рBR322 плазмиду фрагмент рДНК, который включает участок рибосомного повтора от –515 позиции до 5321 по отношению к точке начала транскрипции (HSU 13369; GenBank accession No.U13369). Фрагмент содержит небольшой фрагмент нетранскрибируемого спейсера, внешний транскрибируемый спейсер (5'ETS) и часть гена 18S рРНК. Зонд биотинировали, используя набор для нуклеотидной метки Biotin NT Labeling Kit (Jena Bioscience GmbH, Jena, Германия).

После проведения гибридации сигнал визуализировали при помощи конъюгата стрептавидин — щелочная фосфатаза (Merck) и колориметрического субстрата. Для количественного определения рДНК по интенсивности сигнала пятна использовали программу Imager 6, позволяющую вычислять интегральную интенсивность сигнала от каждого пятна. Сигналы от всех пятен, соответствующих одному и тому же образцу, суммировали и вычисляли среднее

арифметическое и среднеквадратическую ошибку для каждого образца. Содержание копий рибосомного повтора рассчитывали по калибровочной кривой, которая отражает зависимость сигнала от числа копий рДНК в контрольных образцах ДНК, которые были нанесены на фильтр в том же количестве, что и анализируемые образцы ДНК. Относительная ошибка анализа составила $5 \pm 3\%$.

Статистическая обработка

Описательная статистика для количественных переменных представлена в табл. 1 в формате среднего арифметического и стандартного отклонения ($\pm SD$), значений медианы и интервала варьирования (I), значений доверительного интервала (CI 95%) и коэффициента вариации ($K_{\text{вар}}$: среднеквадратичное отклонение, разделенное на среднее). Сравнение двух групп проводили методом непараметрической статистики Манна–Уитни (p). Для сравнения нескольких групп использовали тест Краскела–Уоллиса (H, p). Распределения измеряемого параметра в группах сравнивали методом Колмогорова–Смирнова (D, α). За критическое значение уровня значимости брали 0,05. С использованием поправки Бонферрони на множественные тесты различия признавали статистически значимыми при $p \leq 0,0062$. Для расчета применили программу StatPlus2007 (<http://www.analystsoft.com/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего проанализировали 488 образцов ДНК, которые выделили из лейкоцитов крови беременных женщин в возрасте 18–45 лет. Число копий рДНК определено методом нерадиоактивной количественной гибридации, который был специально разработан для анализа tandemных рибосомных повторов генома человека [16]. Для гибридации использовали биотинированный ДНК-зонд, который гомологичен фрагменту рибосомного повтора длиной 5836 нуклеотидов (рис. 1А). Количество рДНК представляли как число копий повтора на диплоидный геном.

Количественные данные для всей выборки, разбитой на восемь групп, представлены на рис. 1Б. В табл. 1 даны характеристики групп и данные описательной статистики. На рис. 1В приведены распределения образцов ДНК в группах по числу копий рДНК в геномах. В исследуемой выборке 488 образцов ДНК содержание рДНК варьирует от 226 до 800 копий на диплоидный геном. В том же диапазоне значений варьирует содержание рДНК в популяции практически здоровых людей без явной генетической патологии в возрасте до 70 лет [3].

Для сравнения на рис. 1В дано распределение образцов ДНК по копииности рДНК в группе долгожителей (данные опубликованы ранее [3]). Число копий рДНК в геномах долгожителей варьирует в узком диапазоне значений от ~ 290 до ~ 520 копий. Этот диапазон представляет своеобразную адаптивную норму для популяции. Люди с большим числом копий рДНК (более 550) и с низким числом копий (менее 280) не доживают до возраста 90 лет и более. В более молодой выборке (от 3 до 75 лет) число образцов ДНК с копииностью рДНК вне диапазона долгожителей составляет около одной трети [3].

Сравнение исследуемых восьми групп беременных женщин по числу копий рДНК в геноме лейкоцитов крови с использованием непараметрической статистики Краскела–Уоллиса выявило достоверные различия между группами (H = 30,2; $p < 10^{-4}$, $n = 8$). Далее с

использованием непараметрической статистики Мана–Уитни мы сравнили группу 1 (женщины с нормально протекающей беременностью, без какой-либо выявленной патологии, родившие здоровых детей без признаков гипоксии и гипотрофии) с группами 2–8. Данные сравнения распределений (метод Колмогорова–Смирнова) и количеств рДНК в группах (метод Манна–Уитни) представлены в табл. 2.

Группа 2 (нарушение маточно-плацентарного кровотока и фетоплацентарная недостаточность) и группа 1 (контроль) с учетом поправки Бонферрони достоверно не различаются по числу копий рДНК ($p > 0,006$) и не различаются распределением этого параметра ($D = 0,12$, $\alpha = 0,29$). Однако при анализе распределений (рис. 1В) обнаружено, что группа 2 содержит в 2 раза больше низкокопийных вариантов рДНК (8%), чем группа 1 (4%).

Группа 3 (врожденные пороки развития и хромосомные аномалии) и группа 4 (истмико-цервикальная недостаточность) также не отличаются от группы 1 по содержанию копий рДНК ($p > 0,006$) и по распределению образцов ДНК по величине параметра в группах. Однако в этих группах нет образцов ДНК с низким числом копий рДНК (менее 290), в отличие от групп 1 и 2.

Анализ методом Краскела–Уоллиса показал, что группы 1–4 не различаются по числу копий рДНК между собой ($H = 2,9$, $p = 0,41$, $n = 4$).

Группы 5 (преждевременное созревание плаценты), 6 (дихориальная диамниотическая двойня), 7 (многоводие) и 8 (крупный плод) не различаются по числу копий рДНК между собой ($H = 1,27$; $p = 0,74$, $n = 4$). Каждая из групп 5–8 достоверно отличается по количеству копий рДНК и/или по распределению признака от контрольной группы 1. Группы содержат меньшие количества копий рДНК в ДНК по сравнению с контролем (табл. 2). Эти группы не содержат образцов ДНК с низкими значениями числа копий рДНК и не содержат образцов с высокими (более 600 копий) количествами рДНК. В группе 1 с нормальной беременностью число таких образцов составляет соответственно 12 и 18%.

Группы 5–8 по содержанию рДНК в геноме и по распределению этого параметра наиболее близки к адаптивной норме числа копий рДНК в группе долгожителей (рис. 1; табл. 1 и 2). Для этих групп характерны относительно низкие значения параметра, низкие коэффициенты вариации (0,12–0,19) по сравнению с группой 1 ($K_{\text{вар}} = 0,25$) и отсутствие низкокопийных (менее 290 копий на геном) вариантов рДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рибосомные повторы человека, расположенные в *p*-районах пяти пар акроцентрических хромосом, характеризуются выраженным количественным полиморфизмом. Диапазон варьирования рДНК в изученной нами выборке составил 595 копий, что подтверждает ранее полученные данные о вариабельности рибосомных повторов [3, 5, 11]. Число копий рДНК у человека — это стабильный, одинаковый во всех клетках организма, генетический признак, который не изменяется в процессе жизни и при действии факторов стресса [3]. Наступление беременности, по-видимому, также не изменяет общее число копий рДНК в геноме лейкоцитов крови женщины.

Мы исследовали вариацию числа копий рДНК в группе женщин с нормально протекающей беременностью (группа 1; табл. 1) по сравнению с женщинами, беременность которых

сопровождалась различными осложнениями. Вся выборка разделилась на две части после анализа количества копий рДНК в геноме.

Нарушение маточно-плацентарного кровотока и фетоплацентарная недостаточность (группа 2), врожденные пороки развития и хромосомные аномалии (группа 3), и истмико-цервикальная недостаточность (группа 4) — эти осложнения не ассоциированы с изменениями в количестве копий рДНК в геномах женщин по сравнению с геномами женщин с нормальной беременностью без осложнений (группа 1). Однако для групп 3 и 4 был обнаружен один нюанс, который не сказался на общем анализе. В этих группах отсутствовали образцы ДНК с очень низким (менее 290 копий) содержанием рДНК. В группах 1 и 2 таких образцов было 4 и 8%.

Группы 5–8, которые включают женщин с преждевременным созреванием плаценты, дихориальной диамниотической двойней, многоводием и крупным плодом, также не содержат низкокопийных вариантов рДНК, в отличие от группы контроля и группы 2 (рис. 1В). Это может говорить о том, что для реализации процесса эмбриогенеза, осложненного причинами, которые указаны для групп 3–8, геном матери должен содержать более 290 копий рДНК. Организм женщины с более низким числом копий рДНК, по-видимому, не способен обеспечить приемлемый уровень биогенеза рибосом для ответа на стресс, индуцируемыйотягощенной беременностью.

В пользу этого говорят данные об ассоциации числа копий рДНК с результативностью процедуры ЭКО. Женщины с низким количеством копий рДНК в геноме (среднее 305 ± 57) не смогли забеременеть после нескольких попыток, в то время как женщины с большим количеством копий рДНК (499 ± 62) успешно забеременели с первой попытки [14].

Мы полагаем, что отсутствие низкокопийных вариантов рДНК в геноме женщин в группах 3–8 ассоциировано с отбором на ранней стадии эмбриогенеза. Наличие патологии/особенности у эмбриона, возможно, требует от генома матери повышенного уровня биогенеза рибосом для реализации развития эмбриона. Низкое количество рДНК в геноме матери, возможно, ассоциировано с остановкой развития эмбриона с патологией/особенностью на ранней стадии. Поэтому на 25–39-й неделе беременности не встречаются низкокопийные варианты в группах 3–8. Кроме того, низкое количество копий рДНК у матери может наследоваться эмбрионом, особенно если в отцовском геноме число копий тоже не велико. Показано, что эмбрионы с низким числом копий рДНК достоверно чаще не развиваются (замершая беременность) по сравнению с эмбрионами с нормальным числом копий рДНК [15]. Отрицательная роль малого числа копий рДНК в отцовском геноме была показана ранее [18]. Авторы установили, что общее число копий рДНК в сперматозоидах коррелирует с уровнем метилирования рДНК и, следовательно, с количеством транскрипционно активных копий рДНК, которые обеспечивают нужный уровень биогенеза рибосом. Сперматозоиды мужчин с идиопатическим бесплодием содержали достоверно меньшее общее число копий рДНК, а значит, и меньшее количество активных копий, чем сперматозоиды мужчин с нормальной фертильностью.

Интересно отметить, что низкое число копий рДНК в геноме ассоциировано не только с недостаточным уровнем биогенеза рибосом. Функции рибосомных повторов в составе ядрышек не ограничиваются продукцией субъединиц для рибосом [19, 20]. Ядрышко —

Таблица 2. Парное сравнение контрольной группы 1 (нормальная беременность без патологии) и выборки Д (адаптивная норма, долгожители) с остальными группами беременных по числу копий рДНК в ДНК и по распределению этого параметра

Сравниваемые группы		Тест Колмогорова–Смирнова		U-тест
X1	X2	D	α	p
1	2	0,12	0,29	0,2
1	3	0,14	0,24	0,34
1	4	0,19	0,23	0,25
1	5	0,4	0,008	0,005*
1	6	0,5	0,0001*	0,0001 *
1	7	0,42	0,001*	0,002*
1	8	0,45	0,006*	0,008
1	$\Sigma(5-8)$	0,45	3·10 ⁻⁹	10-8
Д	1	-0,29	0,00002*	0,0002*
Д	2	-0,26	0,001*	0,12
Д	3	-0,23	0,02	0,02
Д	4	-0,21	0,21	0,34
Д	5	0,2	0,5	0,09
Д	6	0,34	0,04	0,002*
Д	7	0,25	0,2	0,02
Д	8	0,29	0,33	0,08

Примечание: * — различия достоверны ($p \leq 0,0062$).

это центр, в котором происходит координация синтеза рибосом, прогресса клеточного цикла и ответа клеток на различные виды стресса. Исследования показали, что эпигенетический статус рибосомных генов и целостность структуры ядрышка могут модулировать гомеостаз клетки [21–23]. Открытие структурных и функциональных связей между ядрышком и остальным геномом клетки позволило высказать предположение, что ядрышко играет ключевую роль в организации архитектуры ядра. Малое количество копий рДНК дестабилизирует гетерохроматин и повышает вероятность хромосомных перестроек [24]. Вариации в числе копий рибосомных повторов изменяют ответ клеток на повреждение ДНК. Клетки с низким содержанием рДНК более чувствительны к различным факторам стресса [25].

Парадоксальным кажется тот факт, что в группах с патологией/особенностью беременности среднее содержание рДНК в геноме снижено по сравнению с контрольной группой, несмотря на отсутствие низкокопийных вариантов рДНК (рис. 1Б, В; табл. 1). В этих группах наряду с отсутствием низкокопийных снижено и число высококопийных образцов ДНК. Интервал варьирования и коэффициент вариации для этих групп значительно снижены по сравнению с группой 1 (нормальная беременность). Казалось бы, большое число копий рДНК в геноме должно обеспечить большее количество рибосом и лучший ответ на стресс, ассоциированный с патологией. Для ответа на этот вопрос мы привлекли данные о вариации числа копий рДНК при генетической патологии и в группе долгожителей, которые опубликованы ранее [3]. Согласно этим данным, большое число копий рДНК в геноме человека ассоциировано с наличием генетической патологии. Геном эмбриона в процессе эмбриогенеза требует более интенсивного синтеза белков для ответа на стресс, индуцируемой этой патологией. Если количество рДНК недостаточно для поддержания приемлемого для реализации генома уровня биогенеза рибосом, то эмбриогенез не происходит. Большое число копий рДНК обнаружили в геномах больных с моногенной патологией (муковисцидоз) и с полигенной патологией (наследственные

формы шизофрении) [3], а также в геномах людей с почечной недостаточностью и с хроническим воспалением [6]. Таким образом, большое число копий рДНК в геноме — это своеобразный маркер наличия в этом геноме мутаций/ полиморфных вариантов последовательности ДНК, которые влияют на многие процессы в организме, на продолжительность жизни и, вероятно, на успешную реализацию репродуктивной функции.

У людей, которые дожили до возраста долгожителей (старше 90 лет) число копий рДНК варьирует в узком диапазоне значений и немного снижено по сравнению с популяцией людей в возрасте до 70 лет. Геномы долгожителей не содержат ни высококопийных, ни низкокопийных вариантов рДНК [3]. Интересно отметить, что распределение образцов ДНК по числу копий рДНК в группах 5–8 не отличается от распределения в группе долгожителей (табл. 2). По-видимому, только геном, который содержит достаточно большое количество рДНК для нормального уровня биогенеза рибосом и не содержит каких-либо вредных для нормального функционирования клеток вариантов последовательности ДНК (маркер — аномально высокое содержание рДНК), позволяет женщине выносить плод, несмотря на преждевременное созревание плаценты, многоводие, наличие двойни и крупного плода.

Ограничения исследования

Необходимо отметить, что выводы по группам с малым количеством женщин (5, 6 и 8; $n < 20$) являются предварительными и требуют проверки на более крупных когортах.

Выводы

Диапазон числа копий рДНК от ~ 300 до ~ 500 в геноме женщины (адаптивная норма, характерная для долгожителей), по-видимому, является оптимальным с точки зрения успешного завершения беременности, даже если возникают осложнения. Низкое число копий рДНК в геноме

женщины ассоциировано с невозможностью реализации эмбриогенеза при наличии патологии/особенности плода. Большое содержание рДНК указывает на наличие в геноме женщины генетических вариантов, которые могут препятствовать протеканию осложненной беременности.

Определение числа копий рДНК в геномах и женщин и мужчин может быть полезным для планирования и прогнозирования течения беременности. Этот подход требует дальнейшего изучения для возможного внедрения в медицинскую практику.

Литература

1. Khatter H, Myasnikov AG, Natchiar SK, Klaholz BP. Structure of the human 80S ribosome. *Nature*. 2015; 520 (7549): 640–5. PubMed PMID: 25901680. DOI: 10.1038/nature14427.
2. McStay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008; 24: 131–57. PubMed PMID: 616426. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259.
3. Veiko NN, Ershova ES, Kondratyeva EI, Porokhovnik LN, Zinchenko RA, Melyanovskaya YL et al. Copy Number Variations of Human Ribosomal Genes in Health and Disease: Role and Causes. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2025; 30 (2): 25765. PubMed PMID: 40018927. DOI: 10.31083/FBL25765.
4. Razaq A, Bejaoui Y, Alam T, Saad M, El Hajj N. Ribosomal DNA Copy Number Variation is Coupled with DNA Methylation Changes at the 45S rDNA Locus. *Epigenetics*. 2023; 18 (1): 2229203. PubMed PMID: 37368968. PMID: PMC10305490. DOI: 10.1080/15592294.2023.2229203.
5. Hori Y, Shimamoto A, Kobayashi T. The human ribosomal DNA array is composed of highly homogenized tandem clusters. *Genome Res*. 2021; 31 (11): 1971–82. PubMed PMID: 34407983; PMID: PMC8559705. DOI: 10.1101/gr.275838.121.
6. Rodriguez-Algarra F, Evans DM, Rakyán VK. Ribosomal DNA copy number variation associates with hematological profiles and renal function in the UK Biobank. *Cell Genomics*. 2024; 4: 100562. PubMed PMID: 38749448; PMID: PMC11228893. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2024.100562>.
7. Law PP, Mikheeva LA, Rodriguez-Algarra F, Asenius F, Gregori M, Seaborne RAE, et al. Ribosomal DNA copy number is associated with body mass in humans and other mammals. *Nat Commun*. 2024; 15 (1): 5006. PubMed PMID: 38866738; PMID: PMC11169392. DOI: 10.1038/s41467-024-49397-5.
8. Veiko NN, Ershova ES, Veiko RV, Umriukhin PE, Kurmyshev MV, Kostyuk GP, et al. Mild cognitive impairment is associated with low copy number of ribosomal genes in the genomes of elderly people. *Front Genet*. 2022; 13: 967448. PubMed PMID: 36199570; PMID: PMC9527325. DOI: 10.3389/fgene.2022.967448.
9. Вейко Н. Н., Терехов С. М., Шубаева Н. О., Смирнова Т. Д., Иванова С. М., Еголина Н. А. и др. «Ранний» и «поздний» ответ культивируемых фибробластов кожи здоровых доноров и больных ревматоидным артритом на окислительный стресс. Взаимосвязь между интенсивностью гибели клеток и количеством активных копий рибосомных генов. *Молекулярная биология*. 2005; 39 (2): 264–75.
10. Ershova ES, Umriukhin PE, Zinchenko RA, Vasilieva TP, Kostyuk SE, Shabalin NY, et al. Variation in the Content of Three Tandem Repeats of the Human Genome (Ribosomal, Satellite III, and Telomere) in Peripheral Blood Leukocyte DNA of People of Different Ages (5–101 Years). *J Aging Res*. 2025; 2025: 8847073. PubMed PMID: 40979377; PMID: PMC12446595. DOI: 10.1155/jare/8847073.
11. Geisen ABC, Santana Acevedo N, Oshima J, Dittrich M, Potabattula R, Haaf T. rDNA Copy Number Variation and Methylation During Normal and Premature Aging. *Aging Cell*. 2025; 24 (5): e14497. PubMed PMID: 39853912; PMID: PMC12073889. DOI: 10.1111/accel.14497.
12. Пороховник Л. Н., Викторов В. В., Еголина Н. А. и др. Полиморфизм размеров кластеров активных рибосомных генов у человека и моделирование условий его стабильности в ряду поколений. *Генетика*. 2011; 47 (12): 1666.
13. Пороховник Л. Н., Еголина Н. А., Косякова Н. В. и др. Зиготический и эмбриональный отбор по геномной дозе активных рибосомных генов как один из возможных факторов сниженной плодовитости супружеских пар. *Медицинская генетика*. 2012; 11: 6 (120): 31–34. EDN QYNYKR.
14. Veiko NN, Ershova ES, Porokhovnik LN, Klimenko MP, Klimenko PA, Umriukhin PE, et al. Ribosomal, Telomere, and Mitochondrial Repeat Copy Number Variations in Female Genomes during Ovarian Stimulation and the Prediction of In Vitro Fertilization Outcome: A Pilot Study. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2023; 15 (3): 9. PubMed PMID: 37806951. DOI: 10.31083/j.fbs1503009.
15. Вейко Н. Н., Ершова Е. С., Костюк С. В., Пороховник Л. Н., Костюк Э. В., Клименко М. П. и др. Вариация числа копий рибосомного повтора в клетках матери и плода при нормальной и неразвивающейся беременности. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2024; 23 (5): 25–31. DOI: 10.20953/1726-1678-2024-5-25-31.
16. Chestkov IV, Jestkova EM, Ershova ES, Golimbet VE, Lezheiko TV, Kolesina NY, et al. Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients. *Schizophr Res*. 2018; 197: 305–14. PubMed PMID: 29336872. DOI: 10.1016/j.schres.2018.01.001.
17. Hori Y, Shimamoto A, Kobayashi T. The human ribosomal DNA array is composed of highly homogenized tandem clusters. *Genome Res*. 2021; 31 (11): 1971–82. DOI: 10.1101/gr.275838.121. PMID: 34407983; PMID: PMC8559705.
18. Michler A, Kießling S, Durackova J, Hahn T, Schorsch M, Haaf T. Sperm rDNA Copy Number and Methylation Are Associated with Male-Factor Infertility. *Int J Mol Sci*. 2025; 26 (21): 10657. DOI: 10.3390/ijms262110657. PMID: 41226693; PMID: PMC12609593.
19. Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8 (7): 574–85. DOI: 10.1038/nrm2184.
20. Pederson T, Tsai RY. In search of nonribosomal nucleolar protein function and regulation. *J Cell Biol*. 2009; 184 (6): 771–6. DOI: 10.1083/jcb.200812014.
21. Pestov DG, Strezoska Z, Lau LF. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol*. 2001; 21 (13): 4246–55. DOI: 10.1128/MCB.21.13.4246-4255.2001.
22. Bursac S, Brdovcak MC, Donati G, Volarevic S. Activation of the tumor suppressor p53 upon impairment of ribosome biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842 (6): 817–30. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.08.014.
23. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress. *Mol Cell*. 2010; 40 (2): 216–27. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.024.
24. Chubb JR, Boyle S, Perry P, Bickmore WA. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr Biol*. 2002; 12 (6): 439–45. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)00695-4.
25. Kobayashi T. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68 (8): 1395–403. DOI: 10.1007/s00018-010-0613-2.

References

- Khatter H, Myasnikov AG, Natchiar SK, Klaholz BP. Structure of the human 80S ribosome. *Nature*. 2015; 520 (7549): 640–5. PubMed PMID: 25901680. DOI: 10.1038/nature14427.
- McStay B, Grummt I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008; 24: 131–57. PubMed PMID: 616426. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259.
- Veiko NN, Ershova ES, Kondratyeva EI, Porokhovnik LN, Zinchenko RA, Melyanovskaya YL et al. Copy Number Variations of Human Ribosomal Genes in Health and Disease: Role and Causes. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2025; 30 (2): 25765. PubMed PMID: 40018927. DOI: 10.31083/FBL25765.
- Razzaq A, Bejaoui Y, Alam T, Saad M, El Hajj N. Ribosomal DNA Copy Number Variation is Coupled with DNA Methylation Changes at the 45S rDNA Locus. *Epigenetics*. 2023; 18 (1): 2229203. PubMed PMID: 37368968. PMCID: PMC10305490. DOI: 10.1080/15592294.2023.2229203.
- Hori Y, Shimamoto A, Kobayashi T. The human ribosomal DNA array is composed of highly homogenized tandem clusters. *Genome Res*. 2021; 31 (11): 1971–82. PubMed PMID: 34407983; PMCID: PMC8559705. DOI: 10.1101/gr.275838.121.
- Rodriguez-Algarra F, Evans DM, Rakyan VK. Ribosomal DNA copy number variation associates with hematological profiles and renal function in the UK Biobank. *Cell Genomics*. 2024; 4: 100562. PubMed PMID: 38749448; PMCID: PMC11228893. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.xgen.2024.100562>.
- Law PP, Mikheeva LA, Rodriguez-Algarra F, Asenius F, Gregori M, Seaborne RAE, et al. Ribosomal DNA copy number is associated with body mass in humans and other mammals. *Nat Commun*. 2024; 15 (1): 5006. PubMed PMID: 38866738; PMCID: PMC11169392. DOI: 10.1038/s41467-024-49397-5.
- Veiko NN, Ershova ES, Veiko RV, Umriukhin PE, Kurmyshev MV, Kostyuk GP, et al. Mild cognitive impairment is associated with low copy number of ribosomal genes in the genomes of elderly people. *Front Genet*. 2022; 13: 967448. PubMed PMID: 36199570; PMCID: PMC9527325. DOI: 10.3389/fgene.2022.967448.
- Veiko NN, Terekhov SM, SHubaeva NO, Smirnova TD, Ivanova SM, Egolina NA, i dr. «Rannij» i «pozdnij» otvet kul'tiviruemykh fibroblastov kozhni zdorovykh donorov i bol'nykh revmatoidnym artritom na oksilitel'nyj stress. Vzaimosvyaz' mezhdru intensivnost'yu gibeli kletok i kolichestvom aktivnykh kopij ribosomnykh genov. *Molekulyarnaya biologiya*. 2005; 39 (2): 264–75. Russian.
- Ershova ES, Umriukhin PE, Zinchenko RA, Vasilieva TP, Kostyuk SE, Shabalin NY, et al. Variation in the Content of Three Tandem Repeats of the Human Genome (Ribosomal, Satellite III, and Telomere) in Peripheral Blood Leukocyte DNA of People of Different Ages (5–101 Years). *J Aging Res*. 2025; 2025: 8847073. PubMed PMID: 40979377; PMCID: PMC12446595. DOI: 10.1155/jare/8847073.
- Geisen ABC, Santana Acevedo N, Oshima J, Dittrich M, Potabattula R, Haaf T. rDNA Copy Number Variation and Methylation During Normal and Premature Aging. *Aging Cell*. 2025; 24 (5): e14497. PubMed PMID: 39853912; PMCID: PMC12073889. DOI: 10.1111/ace1.14497.
- Porohovnik LN, Viktorov VV, Egolina NA, i dr. Polimorfizm razmerov klasterov aktivnykh ribosomnykh genov u cheloveka i modelirovanie uslovij ego stabil'nosti v ryadu pokolenij. *Genetika*. 2011; 47 (12): 1666. Russian.
- Porohovnik LN, Egolina NA, Kosyakova NV, i dr. Zigoticheskiy i embrional'nyj otbor po genomnoj doze aktivnykh ribosomnykh genov kak odin iz vozmozhnykh faktorov snizhennoj plodovitosti supruzheskiy par. *Medicinskaya genetika*. 2012; 11: 6 (120): 31–34. Russian.
- Veiko NN, Ershova ES, Porokhovnik LN, Klimenko MP, Klimenko PA, Umriukhin PE, et al. Ribosomal, Telomere, and Mitochondrial Repeat Copy Number Variations in Female Genomes during Ovarian Stimulation and the Prediction of In Vitro Fertilization Outcome: A Pilot Study. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2023; 15 (3): 9. PubMed PMID: 37806951. DOI: 10.31083/j.fbs1503009.
- Veiko NN, Ershova ES, Kostyuk SV, Porohovnik LN, Kostyuk EV, Klimenko MP, i dr. Variaciya chisla kopij ribosomnogo povtora v kletkah materi i ploda pri normal'noj i nerazvivayushcheysya beremennosti. Voprosy ginekologii, akusherstva i perinatologii. 2024; 23 (5): 25–31. DOI: 10.20953/1726-1678-2024-5-25-31. Russian.
- Chestkov IV, Jestkova EM, Ershova ES, Golimbet VE, Lezheiko TV, Kolesina NY, et al. Abundance of ribosomal RNA gene copies in the genomes of schizophrenia patients. *Schizophr Res*. 2018; 197: 305–14. PubMed PMID: 29336872. DOI: 10.1016/j.schres.2018.01.001.
- Hori Y, Shimamoto A, Kobayashi T. The human ribosomal DNA array is composed of highly homogenized tandem clusters. *Genome Res*. 2021; 31 (11): 1971–82. DOI: 10.1101/gr.275838.121. PMID: 34407983; PMCID: PMC8559705.
- Michler A, Kießling S, Durackova J, Hahn T, Schorsch M, Haaf T. Sperm rDNA Copy Number and Methylation Are Associated with Male-Factor Infertility. *Int J Mol Sci*. 2025; 26 (21): 10657. DOI: 10.3390/ijms262110657. PMID: 41226693; PMCID: PMC12609593.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8 (7): 574–85. DOI: 10.1038/nrm2184.
- Pederson T, Tsai RY. In search of nonribosomal nucleolar protein function and regulation. *J Cell Biol*. 2009; 184 (6): 771–6. DOI: 10.1083/jcb.200812014.
- Pestov DG, Strezoska Z, Lau LF. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol*. 2001; 21 (13): 4246–55. DOI: 10.1128/MCB.21.13.4246-4255.2001.
- Bursac S, Brdovcak MC, Donati G, Volarevic S. Activation of the tumor suppressor p53 upon impairment of ribosome biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1842 (6): 817–30. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.08.014.
- Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress. *Mol Cell*. 2010; 40 (2): 216–27. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.024.
- Chubb JR, Boyle S, Perry P, Bickmore WA. Chromatin motion is constrained by association with nuclear compartments in human cells. *Curr Biol*. 2002; 12 (6): 439–45. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)00695-4.
- Kobayashi T. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68 (8): 1395–403. DOI: 10.1007/s00018-010-0613-2.

ПОДГОТОВКА И АЛГОРИТМ ИССЛЕДОВАНИЯ АДГЕЗИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ БИОКЕРАМИКИ КЛЕТОК МЕТОДОМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

К. В. Данилко , В. А. Солнцев, Р. В. Плотницкий, А. В. Михайлова, А. Р. Билялов, С. С. Чугунов, М. Ф. Галаутдинов, В. Н. Акбашев, И. Ш. Ахатов
Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в настоящее время позволяет анализировать поверхности различных материалов, в том числе эукариотических клеток. Способность клеток различных тканей организма прикрепляться и расти на поверхности материалов для имплантации служит важной характеристикой их биосовместимости. СЭМ позволяет напрямую визуализировать характер контакта клеток с поверхностью. Однако методика подготовки проб к анализу традиционно требует высокой степени обезвоживания образца и применения токсичного тетраоксида осмия. Целью работы было провести оптимизацию методики подготовки животных клеток, растущих на поверхности биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ. В работе предложена методика подготовки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, выращенных на поверхности трех типов биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ. Она включает фиксацию с помощью альдегида, спиртовое обезвоживание, подкрашивание красителем Гимзы и высушивание с последующим напылением золота. Предложен также алгоритм поиска прикрепленных клеток на поверхности пористого и шероховатого материала. Данный подход позволяет быстро подготовить клетки к СЭМ-анализу без использования высокотоксичных реагентов.

Ключевые слова: биокерамика, сканирующая электронная микроскопия, пробоподготовка, напыление, мезенхимальные стволовые клетки

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-20042. Работа выполнена на оборудовании, приобретенном за счет средств программы «Приоритет 2030».

Вклад авторов: К. В. Данилко — планирование исследования, разработка протоколов исследования, анализ результатов, проведение СЭМ, подготовка черновика рукописи; В. А. Солнцев, Р. В. Плотницкий — культивирование клеток, подготовка к СЭМ; А. В. Михайлова — проведение СЭМ, анализ результатов; А. Р. Билялов — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка черновика рукописи; С. С. Чугунов — планирование исследования, анализ литературы; М. Ф. Галаутдинов — сбор, анализ, интерпретация данных; В. Н. Акбашев — анализ литературы, подготовка рукописи; И. Ш. Ахатов — планирование исследования, редактирование рукописи.

 **Для корреспонденции:** Ксения Владимировна Данилко
ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Россия; kse-danilko@yandex.ru

Статья получена: 13.11.2025 **Статья принята к печати:** 04.12.2025 **Опубликована онлайн:** 17.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.072

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/>).

PREPARATION AND PROCEDURE FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY EXAMINATION OF CELLS ADHERED TO BIOCERAMIC SURFACES

Danilko KV , Solntsev VA, Plotnitsky RV, Mikhailova AV, Bilyalov AR, Chugunov SS, Galautdinov MF, Akbashev VN, Akhatov ISH
Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

Scanning electron microscopy (SEM) enables the analysis of surfaces of various materials, including eukaryotic cells. The ability of cells of various body tissues to attach and grow on the surface of implantation materials is an important characteristic of their biocompatibility. SEM visualizes how cells adhere to the surfaces. However, sample preparation for SEM analysis traditionally requires extensive dehydration and the use of toxic osmium tetroxide. This study aimed to optimize the process of preparing animal cells grown on the surface of bioceramic samples for SEM analysis. We propose a new SEM analysis preparation method for mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue cultured on the surface of three types of bioceramics. The method includes fixation with aldehyde, alcohol dehydration, staining with Giemsa dye, drying, and gold spraying. We also propose an algorithm for detecting cells attached to the surface of a porous and rough material. This approach accelerates the preparation of cells for SEM analysis and eliminates the need for highly toxic reagents.

Keywords: bioceramics, scanning electron microscopy, sample preparation, sputtering, mesenchymal stem cells

Funding: the work was supported by grant No. 23-15-20042 from the Russian Science Foundation. The study utilized the equipment purchased under the "Priority 2030" program.

Author contribution: Danilko KV — study planning, development of study protocols, analysis of results, conducting SEM analysis, manuscript drafting; Solntsev VA, Plotnitsky RV — cell culturing, preparation for SEM; Mikhailova AV — conducting SEM analysis, analysis of results; Bilyalov AR — study planning, literature analysis, interpretation of data, manuscript drafting; Chugunov SS — study planning, literature analysis; Galautdinov MF — data collection, analysis, interpretation; Akbashev VN — literature analysis, manuscript drafting; Akhatov IS — study planning, manuscript editing.

 **Correspondence should be addressed:** Ksenia V. Danilko
Lenina, 3, Ufa, 450008, Russia; kse-danilko@yandex.ru

Received: 13.11.2025 **Accepted:** 04.12.2025 **Published online:** 17.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.072

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/>).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) позволяет визуализировать поверхности различных материалов. В последнее время этот метод находит все большее применение для изучения биологических объектов и характера взаимодействия эукариотических клеток с органическими и

неорганическими материалами, в частности керамическими имплантатами [1].

Биокерамические материалы занимают важное место среди современных биосовместимых конструкций, используемых в регенеративной медицине, травматологии-

ортопедии, нейрохирургии, челюстно-лицевой хирургии. Благодаря своей химической инертности, биосовместимости и способности к остеоинтеграции они широко применяются при создании костных имплантатов, osteoplastических композиций и тканеинженерных каркасов. Наиболее изученные представители этой группы — гидроксиапатит, трикальцийфосфат и различные композиции на их основе [2]. Морфология и микрорельеф поверхности биокерамики в значительной степени определяют характер адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток, что напрямую влияет на качество интеграции имплантата с тканями организма [3].

Оценка взаимодействия клеток с поверхностью биоматериала требует применения высокоточных методов визуализации, способных воспроизводить топографию образца на микронном и субмикронном уровнях. Традиционные методы световой и флуоресцентной микроскопии позволяют лишь косвенно оценивать состояние клеток и их распределение, но не дают представления о характере контакта между клеточной мембраной и поверхностью материала. В этом отношении сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является оптимальным инструментом, обеспечивающим визуализацию клеточных структур с высоким пространственным разрешением и глубиной резкости. Метод позволяет детально рассматривать форму клеток, состояние их цитоплазматических выростов, характер прилегания к поверхности и степень формирования внеклеточного матрикса [4].

Однако применение СЭМ для анализа биологических образцов сопряжено с рядом методических трудностей. Основные ограничения — высокий процент содержания воды в клетках, отсутствие электрической проводимости и склонность к разрушению при высушивании [5]. Для предотвращения деформации клеточной структуры требуются фиксация и постепенная дегидратация, что традиционно достигается с использованием токсичных веществ, таких как глутаровый альдегид и тетраоксид осмия, и многоступенчатых процедур критической сушки. Тетраоксид осмия относится к высокотоксичным соединениям, что требует организации особых условий для обеспечения безопасности. Протокол сушки в критической точке требует подбора условий для каждого конкретного материала и типа клеток и занимает около 24 ч. Кроме того, большинство существующих протоколов ориентированы на исследование плоских стеклянных или металлических подложек, тогда как биокерамические образцы обладают выраженной микрорельефной и пористой поверхностью, что осложняет поиск клеток и снижает воспроизводимость результатов [6, 7].

Токсичность реагентов, длительность подготовки и высокая стоимость оборудования (в частности, установки для критической сушки с диоксидом углерода) делают подобные протоколы малоприменимыми для рутинных лабораторных исследований. При этом сохранение морфологических особенностей клеток и обеспечение качественной визуализации при минимальных изменениях исходной структуры остаются критически важными условиями для корректной интерпретации данных [8]. Следовательно, возникает необходимость в разработке более простой, экономичной и безопасной схемы пробоподготовки клеточных образцов для СЭМ-анализа, которая обеспечивала бы высокую воспроизводимость результатов и хорошее качество изображений без применения токсичных соединений и дорогостоящих технологий.

Особое значение имеет создание алгоритма, позволяющего надежно фиксировать и визуализировать клетки, выращенные на поверхности биокерамики, с сохранением их формы, целостности мембраны и элементов цитоскелета. Такая методика должна быть адаптирована к особенностям материала, обладать технологической простотой и не требовать сложного оборудования. Реализация этих условий позволит значительно расширить возможности рутинной морфологической оценки биосовместимых материалов и повысить доступность СЭМ-анализа в лабораторной практике [9].

Цель нашей работы — оптимизация методики подготовки животных клеток, растущих на поверхности биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка образцов биокерамики

Подробно методика изготовления биокерамических образцов описана нами ранее [10]. Для эксперимента использовали три вида образцов биокерамических материалов. Материал для 3D-печати на основе аллотрансплантата, полученный из кадаверной костной ткани человека, предварительно подвергли прокаливанию, измельчили в порошок микронного размера для создания фотополимеризуемой суспензии и использовали в процессе аддитивного производства на основе цифровой обработки света. Для аддитивно изготовленных образцов гидроксиапатита и трикальцийфосфата после печати проводили термическую обработку — спекание при различных температурах для удаления влаги и органических компонентов связующей системы. Все образцы представляли собой цилиндры диаметром 3,6–4,5 мм и высотой 1,9–2,6 мм.

Стерилизация

Стерилизацию проводили с помощью нагревания образцов в сухожаровом шкафу до 180 °С в течение 60 мин. После стерилизации образцы размещали в лунках культурального планшета в боксе микробиологической безопасности 2-го класса («Ламинарные системы», Россия).

Подготовка клеток

Мезенхимальные стволовые клетки человека из жировой ткани (МСК ЖТ) (Биолот, Россия) культивировали в среде DMEM (Carbicorn, Германия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Biowest, Франция) и 2% L-глутамин (Servicebio, Китай) до достижения ими 90% покрытия дна культурального планшета. Далее клетки снимали с помощью 0,25%-го раствора трипсина («Биолот», Россия), промывали 1 раз раствором фосфатно-солевого буфера без кальция и магния (ФСБ, Панэко, Россия) и снова ресуспендировали в полной культуральной среде.

Посев клеток в планшеты

После ресуспендирования МСК рассеивали по 5000 клеток на лунку 96-луночного культурального планшета в концентрации 100 000 клеток на 1 мл. Для этого 50 мкл суспензии наносили на центр цилиндрического образца и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С, содержании 5% CO₂ в воздухе в условиях влажной среды для прикрепления клеток к поверхности. Для каждого типа

образцов готовили по две лунки планшета. По истечении времени адгезии в каждую лунку добавляли по 150 мкл полной культуральной среды и оставляли клетки для пролиферации на образцах биокерамики в течение 7 суток в условиях CO₂-инкубатора.

Мезенхимальные стволовые клетки, адгезированные к поверхности после культивирования, были готовы к анализу с помощью СЭМ.

Подготовка клеток на поверхности биокерамики к СЭМ

Промывка образцов

Необходимые реагенты: фосфатно-солевой буфер без кальция и магния.

Этапы промывки

1. По истечении времени культивирования во все анализируемые лунки добавляли по 500 мкл ФСБ для промывания образцов керамики от остатков питательной среды.

2. Жидкость аккуратно отбирали.
3. Процедуру повторяли дважды.

Фиксация и дегидратация образцов

Необходимые реагенты: глутаровый альдегид 2,5% по объему в деионизированной воде; физиологический раствор (NaCl, 0,9%); этанол 50% (здесь и далее готовили разведения из 95%-го этанола разбавлением деионизированной водой по объему); этанол 70%; этанол 80%; этанол 90%; этанол 95%; этанол 99% надкупоросный.

Этапы фиксации

1. В каждую лунку добавляли по 300 мкл 2,5%-го глутарового альдегида на 30 мин. Объем глутарового альдегида в 10 раз превышал объем образца для фиксации.

2. Глутаровый альдегид удаляли и добавляли к образцам 10-кратный объем физиологического раствора для промывания.

3. Удаляли жидкость полностью.
4. Процедуру промывания повторяли дважды.

Этапы дегидратации

5. После удаления жидкости проводили дегидратацию клеток. Добавляли этанол 50% до полного покрытия образца.

6. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

7. Удаляли этанол 50% и добавляли этанол 70% до полного покрытия образца.

На данном этапе можно прервать протокол и хранить образцы при температуре +4 °С в закрытом состоянии для предотвращения испарения спирта.

8. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

9. Удаляли этанол 70% и добавляли этанол 80% до полного покрытия образца.

10. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

11. Удаляли этанол 80% и добавляли этанол 90% до полного покрытия образца.

12. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

13. Удаляли этанол 90% и добавляли этанол 95% до полного покрытия образца.

14. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

15. Удаляли этанол 95% и добавляли этанол 99% до полного покрытия образца.

16. Выдерживали образцы в растворе 60 с при комнатной температуре.

17. После завершения фиксации образец высушивали на воздухе и переходили к окрашиванию или хранили образцы до использования.

Окрашивание

Процедуру окрашивания клеток на поверхности керамического образца использовали для их визуализации, поскольку в процессе культивирования, перемещения, промывания и фиксации образцы могут переворачиваться в лунках. Клетки же преимущественно будут располагаться на поверхности образца, обращенной в сторону жидкости в лунке, но не к ее дну. Окрашенные клетки можно рассмотреть невооруженным глазом либо в световой микроскоп для выбора ориентации образца при монтировании на столик для СЭМ.

Необходимые реагенты: раствор красителя Гимзы, Панэко, Россия.

Этапы окрашивания

1. Образец полностью покрывали раствором красителя Гимзы.

2. Инкубировали 2 мин при комнатной температуре.

3. Заполняли лунку деионизированной водой для промывания.

4. Покачивали планшет в течение 2 мин.

5. Жидкость полностью удаляли и промывали лунки большим объемом водопроводной воды до просветления жидкости.

6. Жидкость полностью удаляли и снова промывали образец деионизированной водой в течение 2 мин.

7. Жидкость удаляли, а окрашенный образец высушивали на воздухе и хранили в закрытом планшете до использования.

Напыление

Необходимое оборудование: настольная установка магнетронного напыления DSR1 (Nanostructured coatings Co, Иран).

Этапы напыления

1. Керамические образцы закрепляли на алюминиевые столики для СЭМ диаметром 1 см с помощью электропроводящей ленты.

2. Предварительная окраска по Гимзе позволяла визуализировать участки, содержащие клетки, окрашенные в сине-фиолетовый цвет. Поверхность с такой окраской ориентировали вверх, без окраски — вниз и фиксировали к электропроводящей ленте.

3. Далее на образцы наносили слой золота толщиной 20–30 нм с помощью напылительной установки в автоматическом режиме.

Анализ поверхности с помощью СЭМ

Необходимое оборудование: сканирующий электронный микроскоп KYKY-EM6900LV (KYKY Technology Co., Ltd. Китай).

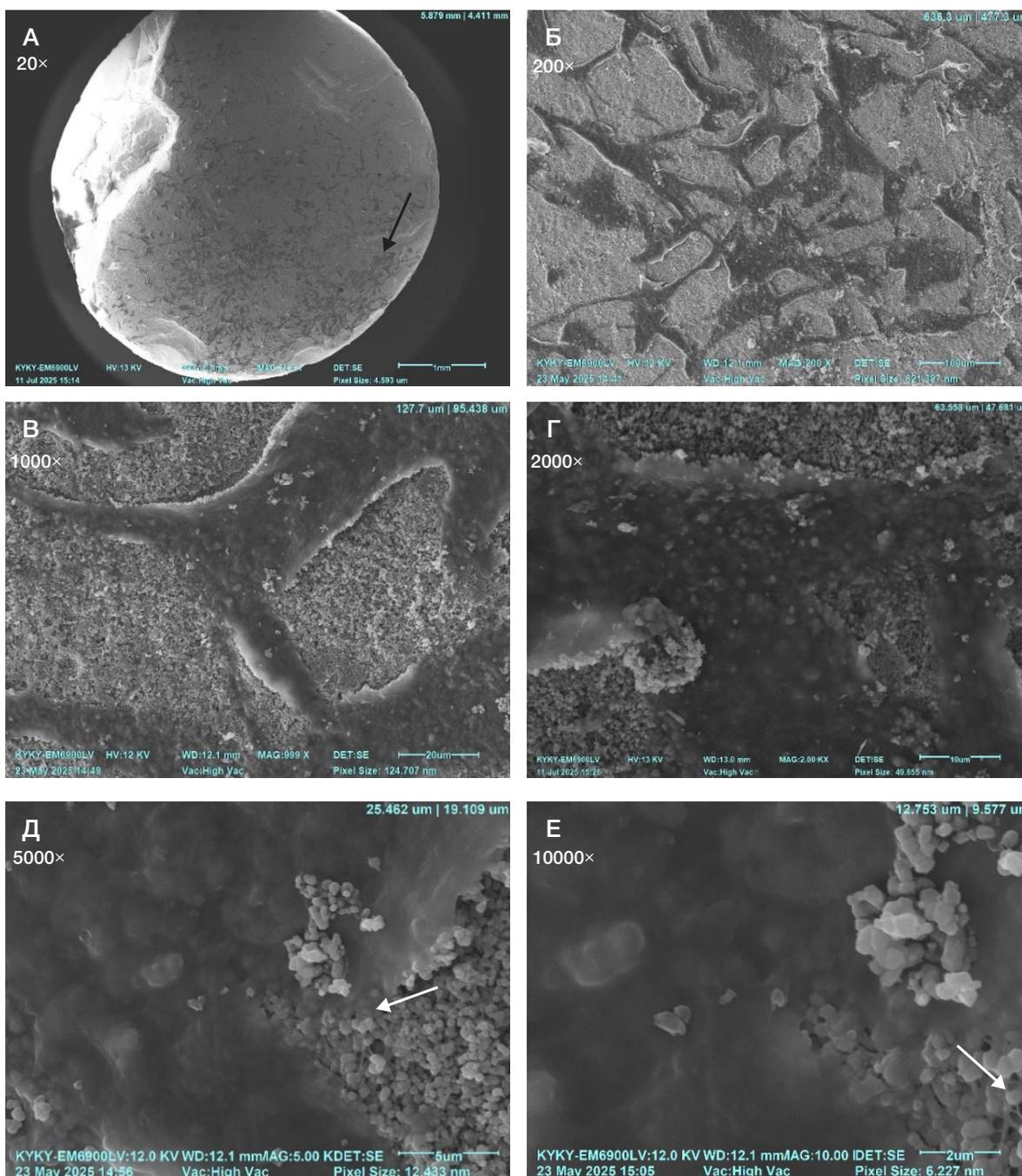


Рис. 1. Сканограммы поверхности образцов трикальцийфосфата после спекания при 800 °С с растущими мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, 7 суток культивирования. Черной стрелкой показаны темные клетки на поверхности цилиндрического образца трикальцийфосфата, белой стрелкой — тонкие выросты мембраны. Клетки крупные, образуют скопление, сильно распластаны, контактируют между собой широкими выростами, поверхность клеток ровная, гладкая, просматриваются тонкие выросты мембраны под телом клетки и по периферии. Увеличение от 20× до 10 000×

Этапы анализа

1. Разместили столики с закрепленными образцами в рабочей камере микроскопа.

2. Установили режим высокого вакуума, напряжение 11–13 кВ, рабочее расстояние 10–14 мм, использовали детектор SE электронов.

3. Провели поиск образца и его центрирование на минимальном увеличении (рис. 1А).

4. Окрашенные красителем Гимзы клетки визуализируются как более темные структуры на поверхности (рис. 1А, черная стрелка).

5. Выбирали отдельные наиболее темные участки на поверхности образца керамики, устанавливали увеличение 2000× или 5000× и настраивали изображение

для подтверждения наличия клетки на данном темном участке. Примечание: данный этап необходим, поскольку более темными могут выглядеть также отдельные участки материала биокерамики.

6. При обнаружении в области темных фрагментов морфологических отличий от частиц биокерамики выбирали меньшее увеличение (200× или 500×) и проводили поиск объектов, отвечающих параметрам клетки (рис. 1Б).

7. В случае обнаружения клетки или группы клеток с помощью данного алгоритма, наблюдали структуры с темной мембраной, практически ровной поверхностью, под которой визуализировались очертания частиц материала керамики или выросты, тяжи разной длины как под телом клетки, так и в области ее внешних краев. Поверхность

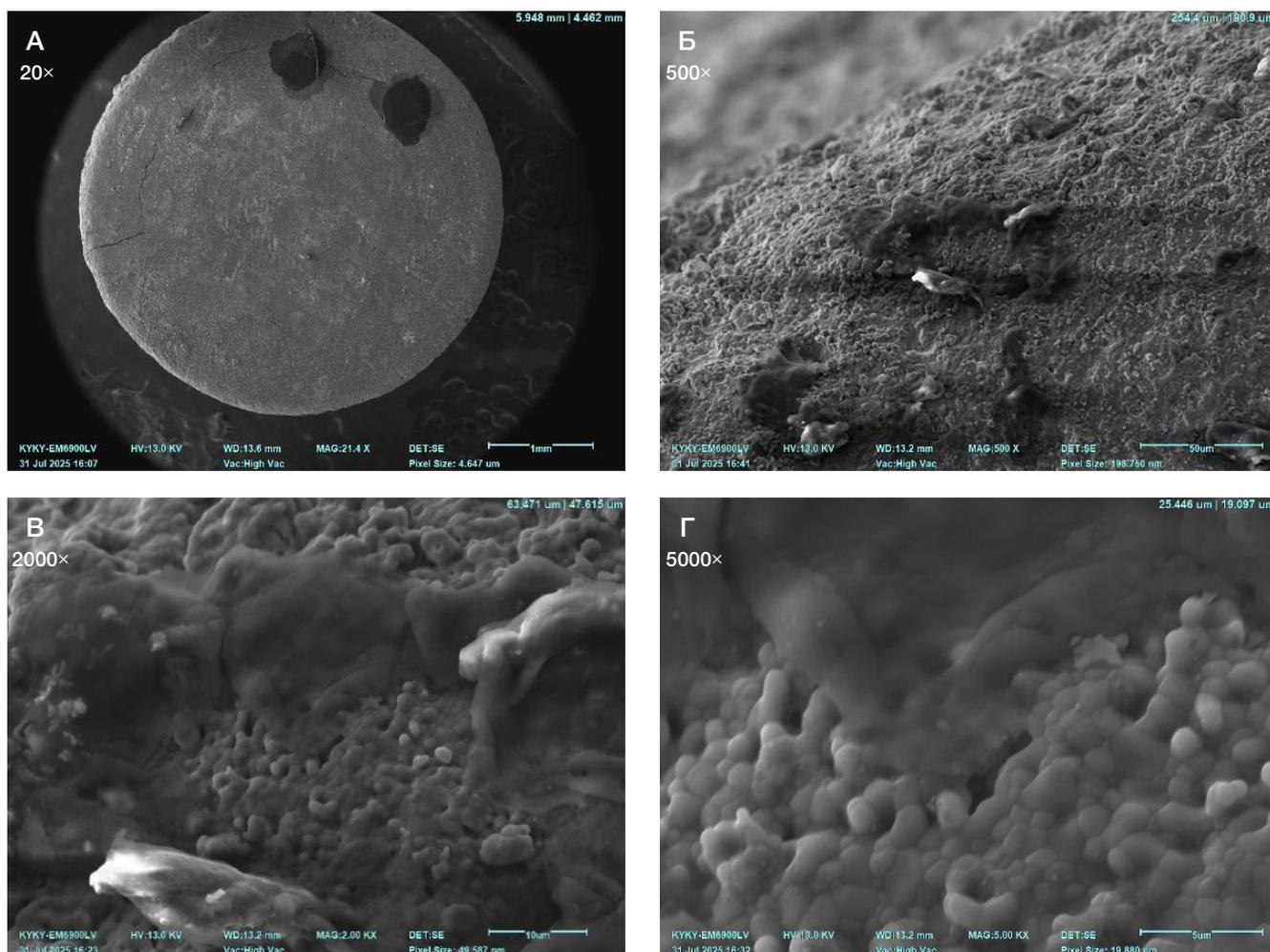


Рис. 2. Сканограммы поверхности образцов гидроксиапатита после спекания при 1250 °С с растущими мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, 7 суток культивирования. Поверхность клеток складчатая, гладкая, наблюдается эффект наползания тела клетки. Увеличение от 20× до 5000×

клетки могла быть менее ровной в зависимости от характера ее роста и качества обезвоживания материала (рис. 1–4).

8. После визуального обнаружения клетки проводили сканирование и получали изображение при условном увеличении 200×, 500×, 2000×, 5000×, 10 000× (рис. 1–4).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования биосовместимости с помощью СЭМ было подготовлено 15 образцов на трех типах материалов. Используемый в работе подход позволил обнаружить клетки на поверхности всех образцов из обработанного костного аллогенного материала человека, гидроксиапатита и трикальцийфосфата (рис. 1–5). Анализ поверхности материала с помощью СЭМ позволил охарактеризовать клеточную морфологию: размеры и форму клеток, однородность поверхности или ее шероховатость, наличие выростов краевой зоны клетки и их длину, наличие выростов под телом клетки, количество клеток на образце.

Среди обнаруженных нами клеток можно выделить несколько морфологических вариантов, характеризующих степень прикрепления клеток к поверхности материала (рис. 5): 1) высокая степень адгезии — крупные, распластанные по поверхности клетки с очень мелкими складками, под которыми можно различить очертания частиц материала поверхности, с длинными тонкими

выростами плазматической мембраны по краям клетки и под ее телом; 2) средняя степень адгезии — клетки распластанные, с мелкими неровностями поверхности, средних размеров, с небольшим числом широких и тонких выростов мембраны в основном по периферии клетки; 3) низкая степень адгезии — относительно некрупные, плоские клетки, имеющие хорошо заметные складки, хорошо заметные регулярные неровности поверхности, без выростов мембраны под телом клетки и по периферии, очертания гранул материала не просматриваются.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что предложенный алгоритм подготовки клеточных культур, выращенных на поверхности биокерамических образцов, обеспечивает сохранение морфологии клеток и достоверную визуализацию зон их взаимодействия с материалом при помощи СЭМ. В отличие от классических схем пробоподготовки, требующих сложного оборудования, длительной подготовки проб и токсичных реагентов, предложенный подход основан на последовательной фиксации и мягкой дегидратации образцов, что делает метод применимым в условиях стандартной лаборатории. Ранее описанные методики, несмотря на применение похожей схемы дегидратации [11], часто приводили к деформации мембран и потере клеточных псевдоподий вследствие изменения поверхностного

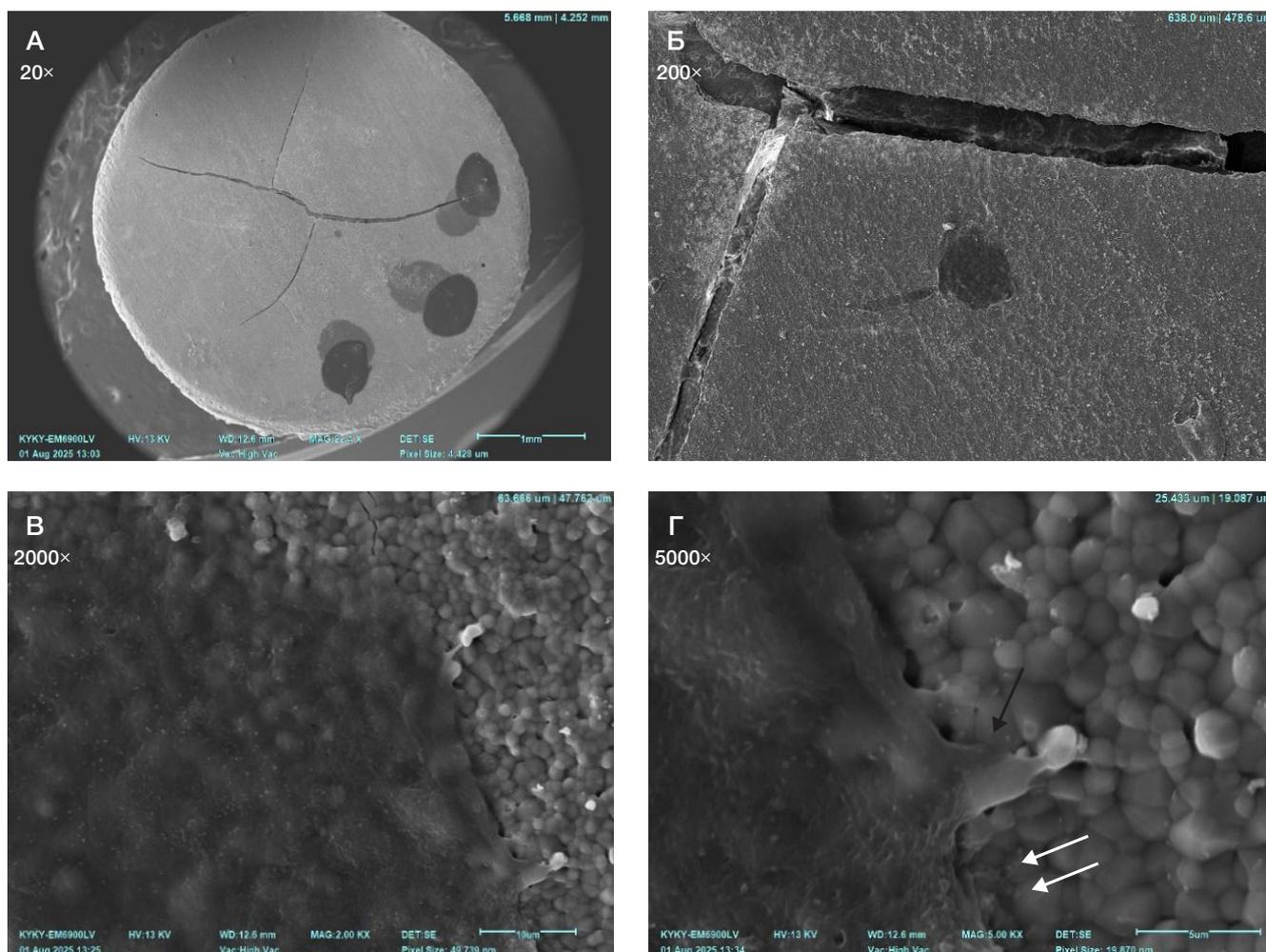


Рис. 3. Сканограммы поверхности образцов трикальцийфосфата после спекания при 1250 °С с растущими мезенхимальными стволовыми клетками из жировой ткани, 7 суток культивирования. *Черная стрелка* — широкая псевдоподия. *Белая стрелка* — тонкий вырост с расширением на конце. Увеличение 20х–5000х. Высокая степень адгезии клетки, она плотно прилегает к поверхности, сильно уплощена, под телом клетки просматривается контур гранул материала, поверхность имеет мелкие углубления, наблюдаются выросты различной толщины по периметру клетки и просматриваются под ее телом

натяжения при обработке образцов. Современные исследования указывают, что даже минимальные различия в микрорельефе и пористости биокерамики могут существенно влиять на адгезию и пространственную ориентацию клеток [12]. В нашем исследовании фиксация с последовательной дегидратацией в градиенте этанола при комнатной температуре позволила избежать подобных искажений и сохранить естественные контуры клеток и микроструктуру материала. Часто применяемая сушка препарата в критической точке является относительно трудоемкой и продолжительной по времени процедурой [13]. В нашем исследовании удалось ограничиться дегидратацией и последующим плазменным напылением золота для обеспечения токопроводимости образца.

Особое значение имеет использование ориентационной окраски раствором красителя Гимзы перед напылением. Этот прием позволил точно позиционировать участки с адгезированными клетками и значительно сократил время поиска зон интереса при электронно-микроскопическом анализе. Подобная комбинация методов визуализации ранее не была описана в отношении биокерамических подложек и может быть полезна при морфологических исследованиях других типов материалов.

Анализ микроскопических изображений показал сохранение характерной для мезенхимальных стволовых клеток формы, наличие периферических выростов и

выраженных контактных зон с поверхностью керамики. На образцах трикальцийфосфата клетки демонстрировали более плотную адгезию и формирование протяженных мембранных выростов, что согласуется с данными о высокой биосовместимости кальций-фосфатных материалов и их стимулирующем влиянии на остеогенную дифференцировку [14]. В то же время на аллогенном материале наблюдалась вариабельность формы клеток, которая зависела от температуры обработки материала и, вероятно, обусловлена неоднородностью структуры поверхности.

Предложенный протокол сочетает воспроизводимость, технологическую простоту и безопасность. Он может быть адаптирован для анализа других типов клеток и подложек, что расширяет возможности морфологической оценки клеточно-материальных интерфейсов в биомедицинских исследованиях и разработке остеointегрирующих имплантатов.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование имеет ряд ограничений. Прежде всего, анализ носил преимущественно качественный характер и не включал количественную морфометрию клеточных структур, что могло бы повысить объективность оценки. Кроме того, работа выполнена на одной клеточной модели —

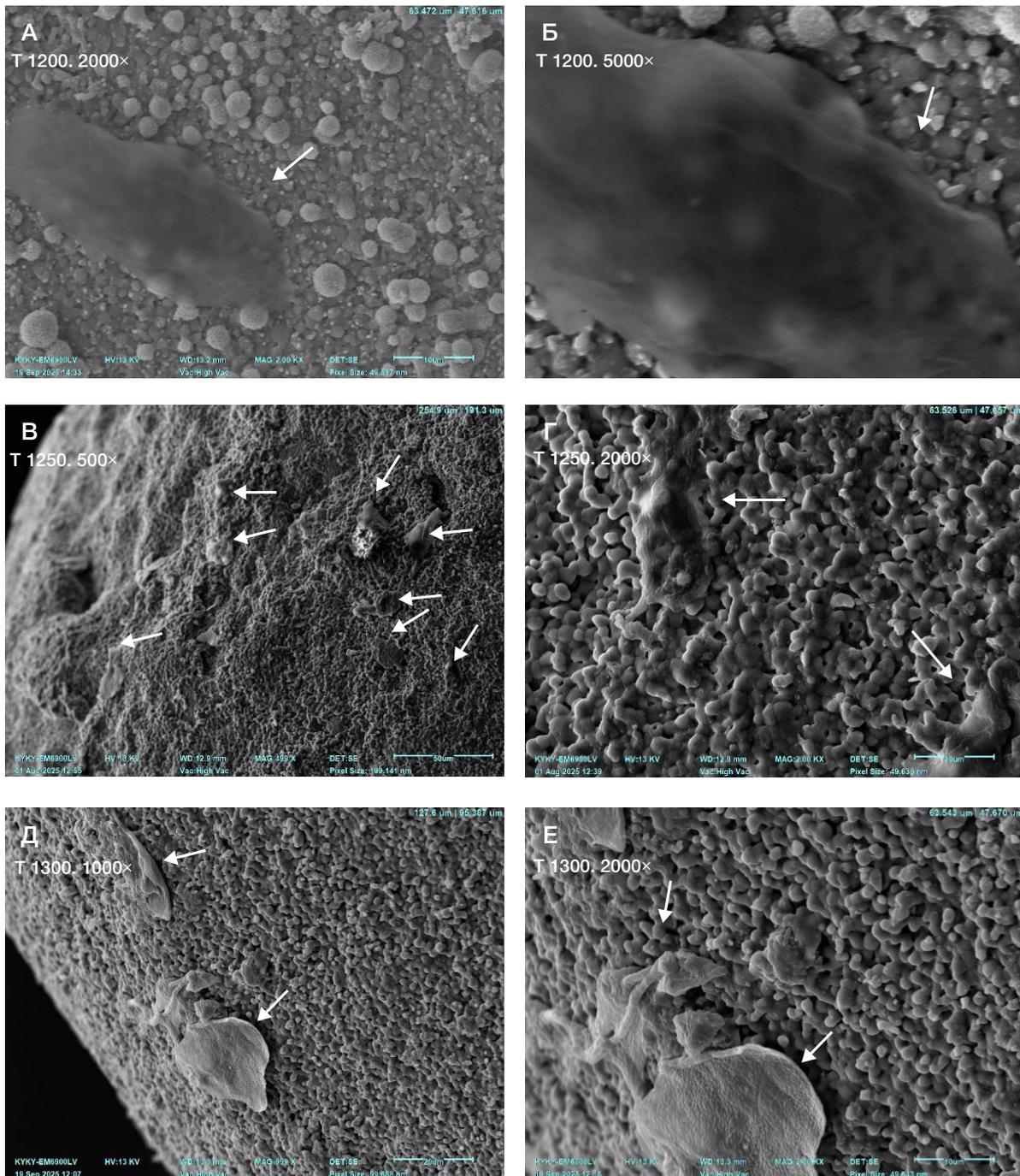


Рис. 4. Характер роста клеток на образцах из костного аллотрансплантата с различными физическими параметрами обработки. Сканограммы. T1200 — температура спекания 1200 °С, T1250 — температура спекания 1250 °С, T1300 — температура спекания 1300 °С. Наблюдается разная степень адгезии клеток к материалу. Белые стрелки указывают на клетки на поверхности материала аллотрансплантата. **А, Б.** Максимальная степень адгезии — клетки плотно прилегают к поверхности, сильно уплотненные, под телом клетки просматривается контур гранул материала, поверхность гладкая, со слабо заметными складками, наблюдаются выросты различной толщины, преимущественно тонкие по периметру клетки и просматриваются под ее телом. **В, Г.** Средняя степень адгезии — клетки прилегают к поверхности, в отдельных зонах края клетки приподняты, поверхность имеет хорошо заметные складки, выросты клетки преимущественно широкие. **Д, Е.** Низкая степень адгезии — клетки слабо распластаны, края клеток заметно приподняты по всему периметру, поверхность клетки имеет мелкие бугорки, отсутствуют выросты

мезенхимальных стволовых клетках жировой ткани человека; для подтверждения универсальности метода требуется проверка на других типах клеток.

Исследование проведено в условиях *in vitro*, что ограничивает возможность прямого переноса полученных данных на ткани *in vivo*. Также не рассматривалось влияние отдельных физико-химических параметров биокерамики на качество визуализации и сохранность клеточной морфологии, что может стать предметом дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

В работе предложена методика подготовки мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани человека, выращенных на поверхности биокерамических образцов, к анализу с помощью СЭМ и проведения самого анализа. Предложенный в работе подход требует не более 1 ч для подготовки клеток к анализу с помощью СЭМ, с учетом этапа высушивания образца, не требует использования токсичных солей тяжелых металлов, позволяет получить

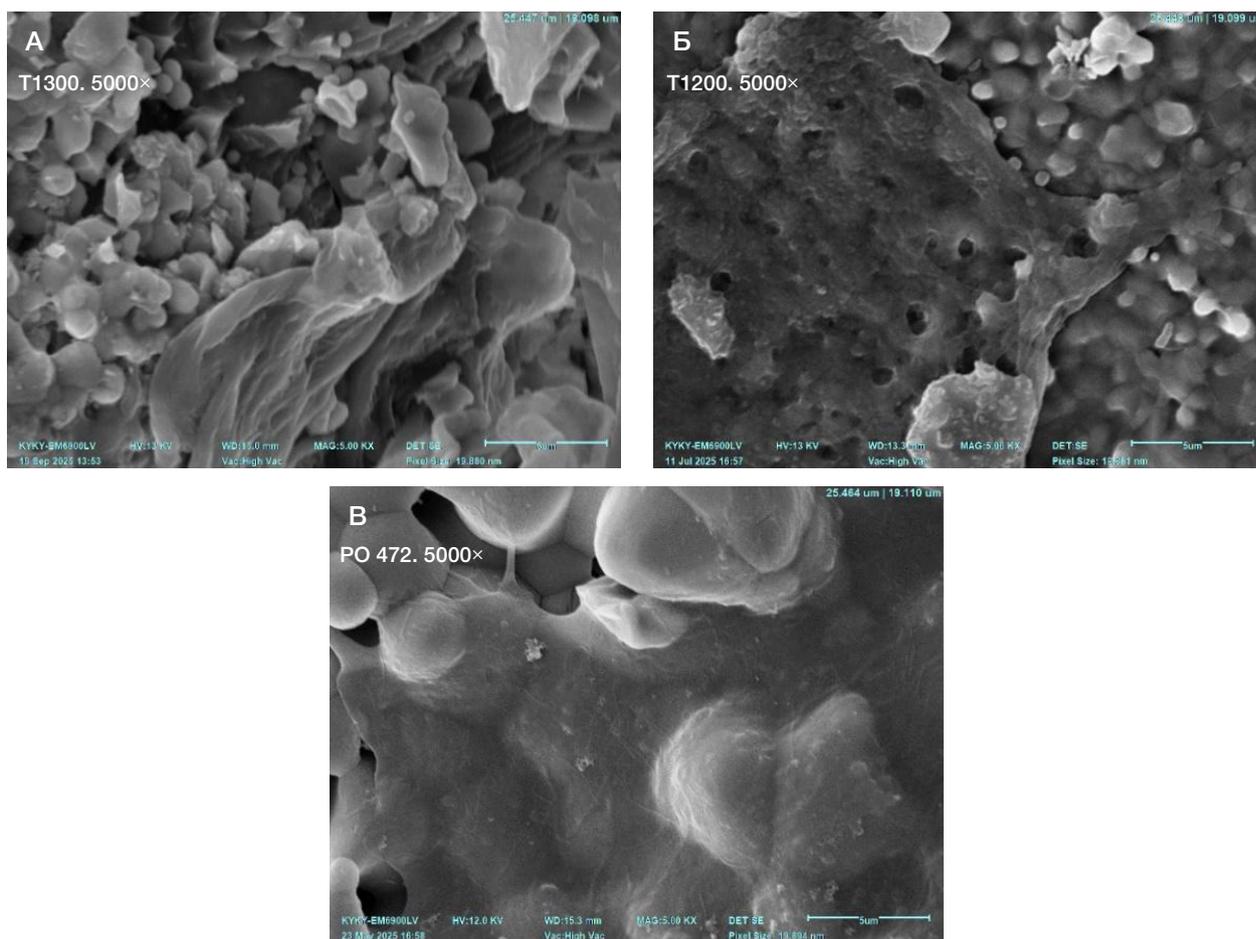


Рис. 5. Морфологические особенности мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани на поверхности образцов из трикальцийфосфата. Сканограммы. **А.** Складчатая поверхность клетки, гладкая, низкая степень распластанныости, адгезия в отдельных точках, отсутствуют выросты тела клетки. **Б.** Клетка распластана, практически полностью адгезирована, поверхность бугристая, наблюдаются широкие и отдельные тонкие выросты в небольшом количестве по периферии. **В.** Клетка сильно распластана, полностью адгезирована, поверхность ровная, наблюдаются широкие и тонкие выросты в большом количестве под телом клетки и по периферии. T1200, T1300 — температура спекания материала при изготовлении образцов в °С. PO 472 — маркировка лабораторного образца

стабильные воспроизводимые результаты. Применение окраски образцов по Гимзе значительно облегчает поиск клеток на поверхности и способствует правильной ориентации образца для исследования. Описанный вариант

пробоподготовки может быть использован и для обработки любых других животных клеток, адгезированных к поверхности любого материала, при условии его устойчивости к обработке глутаровым альдегидом и этанолом.

Литература

- Zhang Y, Shen Y, Peng F, Jiang C, Li W, Miao H, Huang F, Zeng Y. Method for acquiring accurate coordinates of the source point in electron backscatter diffraction. *J Microsc.* 2021; 284 (3): 233–243. DOI: 10.1111/jmi.13055. PubMed PMID: 34383320.
- Eliasz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel).* 2017; 10 (4): 334. DOI: 10.3390/ma10040334. PubMed PMID: 28772697.
- Kim SE, Park K. Recent Advances of Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Regeneration. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1250: 177–88. DOI: 10.1007/978-981-15-3262-7_12. PubMed PMID: 32601945.
- Koga D, Kusumi S, Shibata M, Watanabe T. Applications of Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron Signals in Neural Structure. *Front Neuroanat.* 2021; 15: 759804. DOI: 10.3389/fnana.2021.759804. PubMed PMID: 34955763; PMCID: PMC8693767.
- Qu Y, Pan H, Peng R, Niu J, Li C. Interference illumination of three nonzero-order beams for LCOS-based structured illumination microscopy. *J Microsc.* 2019; 275 (2): 97–106. DOI: 10.1111/jmi.12806. PubMed PMID: 31087655.
- Bray DF, Bagu J, Koegler P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech.* 1993; 26 (6): 489–95. DOI: 10.1002/jemt.1070260603. PubMed PMID: 8305726.
- Fakhrullin R, Nigmatzyanova L, Fakhrullina G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci Total Environ.* 2021; 772: 145478. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145478. PubMed PMID: 33571774.
- Orhan EO, Bahadır D, Akgün C, Aktaş S. Scanning electron microscopic evaluation of the efficacy of 5% ethylenediaminetetraacetic acid for smear layer removal. *Microsc Res Tech.* 2021; 84 (2): 253–60. DOI: 10.1002/jemt.23582. PMID: 32905662.
- Teixeira S, Ferraz MP, Monteiro FJ. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19 (2): 855–9. DOI:

- 10.1007/s10856-007-3005-x. Epub 2007 Aug 1. PubMed PMID: 17665126.
10. Bilyalov A, Piatnitskaia S, Rafikova G, et al. The effect of sterilization methods on the cytotoxicity of ceramic medical implants. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2025; 1: 77–84. DOI: 10.24075/brsmu.2025.009.
 11. Ullah N, Guhar D, Khan S. Preparation and topographical studies of various biological specimens using alternate method to critical point drying: Scanning electron microscopy. *J Microsc*. 2025; 299 (1): 25–35. DOI: 10.1111/jmi.13412. PubMed PMID: 40171741.
 12. Skliarenko Y, Kolomiets VV, Balatskyi VV, et al. The impact of the physicochemical properties of calcium phosphate ceramics on biocompatibility and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes*. 2024; 17, 295. DOI: 10.1186/s13104-024-06937-y.
 13. Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, Lagonegro P, Trevisi G, et al. Preparation of hybrid samples for scanning electron microscopy (SEM) coupled to focused ion beam (FIB) analysis: A new way to study cell adhesion to titanium implant surfaces. *PLOS ONE*. 2022; 17 (8): e0272486. DOI: 10.1371/journal.pone.0272486.
 14. Gou Y, Qi K, Wei Y, Gu Z, Xie H. Advances of calcium phosphate nanoceramics for the osteoinductive potential and mechanistic pathways in maxillofacial bone defect repair. *Nano TransMed*. 2024; 3: 100033. DOI: 10.1016/j.ntm.2024.100033.

References

1. Zhang Y, Shen Y, Peng F, Jiang C, Li W, Miao H, Huang F, Zeng Y. Method for acquiring accurate coordinates of the source point in electron backscatter diffraction. *J Microsc*. 2021; 284 (3): 233–243. DOI: 10.1111/jmi.13055. PubMed PMID: 34383320.
2. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel)*. 2017; 10 (4): 334. DOI: 10.3390/ma10040334. PubMed PMID: 28772697.
3. Kim SE, Park K. Recent Advances of Biphasic Calcium Phosphate Bioceramics for Bone Tissue Regeneration. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1250: 177–88. DOI: 10.1007/978-981-15-3262-7_12. PubMed PMID: 32601945.
4. Koga D, Kusumi S, Shibata M, Watanabe T. Applications of Scanning Electron Microscopy Using Secondary and Backscattered Electron Signals in Neural Structure. *Front Neuroanat*. 2021; 15: 759804. DOI: 10.3389/fnana.2021.759804. PubMed PMID: 34955763; PMCID: PMC8693767.
5. Qu Y, Pan H, Peng R, Niu J, Li C. Interference illumination of three nonzero-order beams for LCOS-based structured illumination microscopy. *J Microsc*. 2019; 275 (2): 97–106. DOI: 10.1111/jmi.12806. PubMed PMID: 31087655.
6. Bray DF, Bagu J, Koegler P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech*. 1993; 26 (6): 489–95. DOI: 10.1002/jemt.1070260603. PubMed PMID: 8305726.
7. Fakhrullin R, Nigamatzyanova L, Fakhrullina G. Dark-field/hyperspectral microscopy for detecting nanoscale particles in environmental nanotoxicology research. *Sci Total Environ*. 2021; 772: 145478. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145478. PubMed PMID: 33571774.
8. Orhan EO, Bahadır D, Akgün C, Aktaş S. Scanning electron microscopic evaluation of the efficacy of 5% ethylenediaminetetraacetic acid for smear layer removal. *Microsc Res Tech*. 2021; 84 (2): 253–60. DOI: 10.1002/jemt.23582. PMID: 32905662.
9. Teixeira S, Ferraz MP, Monteiro FJ. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. *J Mater Sci Mater Med*. 2008; 19 (2): 855–9. DOI: 10.1007/s10856-007-3005-x. Epub 2007 Aug 1. PubMed PMID: 17665126.
10. Bilyalov A, Piatnitskaia S, Rafikova G, et al. The effect of sterilization methods on the cytotoxicity of ceramic medical implants. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2025; 1: 77–84. DOI: 10.24075/brsmu.2025.009.
11. Ullah N, Guhar D, Khan S. Preparation and topographical studies of various biological specimens using alternate method to critical point drying: Scanning electron microscopy. *J Microsc*. 2025; 299 (1): 25–35. DOI: 10.1111/jmi.13412. PubMed PMID: 40171741.
12. Skliarenko Y, Kolomiets VV, Balatskyi VV, et al. The impact of the physicochemical properties of calcium phosphate ceramics on biocompatibility and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *BMC Res Notes*. 2024; 17, 295. DOI: 10.1186/s13104-024-06937-y.
13. Parisi L, Toffoli A, Ghezzi B, Lagonegro P, Trevisi G, et al. Preparation of hybrid samples for scanning electron microscopy (SEM) coupled to focused ion beam (FIB) analysis: A new way to study cell adhesion to titanium implant surfaces. *PLOS ONE*. 2022; 17 (8): e0272486. DOI: 10.1371/journal.pone.0272486.
14. Gou Y, Qi K, Wei Y, Gu Z, Xie H. Advances of calcium phosphate nanoceramics for the osteoinductive potential and mechanistic pathways in maxillofacial bone defect repair. *Nano TransMed*. 2024; 3: 100033. DOI: 10.1016/j.ntm.2024.100033.

РАЗРАБОТКА КЛАССИФИКАТОРА СОСТОЯНИЙ СОСУДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ КОНТРОЛИРУЕМОГО МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

З. В. Беседовская^{1,2}✉, А. Ю. Коробов³, Н. И. Кудряшова⁴

¹ Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² Центр искусственного интеллекта, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Центр фотоники и фотонных технологий, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

⁴ Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Количественная обработка оптоакустических ангиограмм — одна из важных задач, решение которой в перспективе позволит диагностировать сосудистые заболевания на ранних стадиях. Целью исследования было провести доработку и медико-биологическую валидацию программного инструмента для анализа оптоакустических ангиограмм с фокусом на применение методов машинного обучения. Работу проводили на открытом наборе данных, содержащем трехмерные оптоакустические ангиограммы экспериментального животного (мыши) в трех температурных состояниях: температура холодной воды (16 °C), комнатная температура (23 °C) и температура тела (30 °C), а также датасет с базовыми параметрами сосудов, полученных при обработке программным обеспечением общего назначения для визуализации и анализа научных и промышленных данных Amira/Avizo (Thermo Fisher Scientific). Были разработаны и посчитаны различные параметры сосудов, отсутствующие в предыдущей работе, после чего применены основные методы неконтролируемой/контролируемой кластеризации и контролируемой классификации для определения принадлежности сегментов сосудов к разным температурным состояниям. Методы контролируемой классификации показали высокую общую точность: CatBoost — 98,9%, SGDClassifier — 95,7%, логистическая регрессия — 99,7%. Полученные результаты согласуются с существующими описаниями изменений сосудов при температурных тестах. Примененная методология универсальна, а значит при небольшой модификации может быть адаптирована для пациентов. Таким образом, полученные результаты в перспективе позволяют улучшить диагностику сосудистых патологий.

Ключевые слова: оптоакустика, кластеризация васкулярных изменений, вазодилатация, вазоконстрикция, ангиография, фотоакустика

Благодарности: авторы статьи выражают признательность авторам опубликованной ранее работы [15] за предоставление открытых данных, которые были использованы при проведении исследования.

Вклад авторов: З. В. Беседовская — разработка пайплайна и инструментов кластеризации, подготовка изображений для публикации, подготовка дrafта публикации; А. Ю. Коробов — создание и интеграция новых дескрипторов сегментов сосудов в пайплайн, подготовка дrafта публикации; Н. И. Кудряшова — медицинская концептуализация и валидация дескрипторов сегментов сосудов, подготовка дrafта публикации.

✉ **Для корреспонденции:** Злата Валерьевна Беседовская
Большой бульвар, д. 30, стр. 1, г. Москва, 121205, Россия; iratnagold@gmail.com

Статья получена: 07.10.2025 **Статья принята к печати:** 10.11.2025 **Опубликована онлайн:** 27.11.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.060

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/>).

DEVELOPMENT OF THE VASCULAR CONDITION CLASSIFIER USING SUPERVISED MACHINE LEARNING METHODS

Besedovskaia ZV^{1,2}✉, Korobov AY³, Kudriashova NI⁴

¹ Vladimir Zelman Center for Neurobiology and Neurorehabilitation Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

² Artificial Intelligence Center Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

³ Center for Photonics and Photonic Technologies Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

⁴ Center for Molecular and Cellular Biology Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

Quantitative processing of optoacoustic angiograms is an important task, the solution of which will potentially enable the early diagnosis of vascular diseases. The aim of this study is to refine and conduct biomedical validation of a software tool for the analysis of optoacoustic angiograms, focusing on the application of machine learning methods. The work was conducted on an open dataset containing three-dimensional optoacoustic angiograms of an experimental animal (mouse) in three temperature conditions: cold temperature (16 °C), room temperature (23 °C), and body temperature (30 °C), as well as a dataset with basic vascular features obtained by processing using Amira/Avizo (Thermo Fisher Scientific), a general-purpose software for visualization and analysis of scientific and industrial data. Various vascular features missing from previous work were developed and calculated, after which basic methods of unsupervised/supervised clustering and supervised classification were applied to determine different temperature conditions of vessel segments. Supervised classification methods demonstrated high overall accuracy: CatBoost — 98.9%, SGDClassifier — 95.7%, and logistic regression — 99.7%. The results are consistent with existing descriptions of vascular changes during temperature tests. The applied methodology is universal, meaning with minor modifications it can be adapted to patients. Therefore, the results of this study may potentially improve the diagnosis of vascular pathologies.

Keywords: ptoacoustics, classification, clustering of vascular changes, vasodilation, vasoconstriction, angiography, photoacoustics, vessels, vascular features

Acknowledgments: All authors of this article express their gratitude to the authors of article [15] for providing the open data used in this study.

Author contribution: Z. Besedovskaya — development of the pipeline and clustering tools, image preparation for publication, and draft publication. A. Korobov — creation and integration of new vessel segment features into the pipeline and draft publication. N. Kudryashova — medical conceptualization and validation of the vessel segment features and draft publication. All authors contributed equally to this study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Zlata Besedovskaia
Bolshoy Bulvar, 30, Building 1, Moscow, 121205; iratnagold@gmail.com

Received: 07.10.2025 **Accepted:** 10.11.2025 **Published online:** 27.11.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.060

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/>).

Оптоакустическая (ОА) ангиография — это новый многообещающий метод визуализации сосудов, применяемый в научных исследованиях и клинической практике. В его основе лежит оптоакустический эффект: акустический отклик материалов на прерывистый свет [1, 2]. Таким образом, метод совмещает оптические и акустические подходы, а сама ангиография основана на оптическом поглощении света гемоглобином [3].

Одно из преимуществ ОА-ангиографии — ее неинвазивность [1]. В диагностике она может дополнять методы визуализации крупных сосудов [4]. По сравнению с методами визуализации мелких сосудов (капилляроскопия, оптическая когерентная томография), ОА обеспечивает большую глубину визуализации [5, 6] и позволяет оценивать состояние артериол, венул, а также мелких артерий и вен [5].

Метод ОА успешно применяют в различных областях как прикладной медицины, так и фундаментальных исследований. Можно выделить успехи метода в офтальмологии [7, 8], дерматологии [9], кардиологии [10], онкологии [11], а также нейровизуализации [12].

Доклинические и фундаментальные биологические исследования играют ключевую роль как в изучении базовых биологических процессов, так и в дальнейшем развитии самой методологии ОА-визуализации [5].

Несмотря на значительные успехи в развитии технологии ОА-визуализации, ее широкому клиническому внедрению препятствует ряд существенных технологических ограничений. К ограничениям метода относятся: низкая скорость визуализации, фундаментальное противоречие между пространственным разрешением и глубиной проникновения, а также инженерные сложности по интеграции систем доставки света и ультразвуковых (УЗ) преобразователей [5, 6].

Применение методов искусственного интеллекта (ИИ) кардинально улучшает ОА-визуализацию. Нейросети, такие как U-Net, эффективно устраняют артефакты и повышают качество изображений. Кроме того, ИИ автоматизирует анализ данных, делая диагностику быстрее и объективнее [13, 14].

Таким образом, использование ИИ способствует преодолению технологических барьеров, обеспечивает более широкое клиническое внедрение ОА-визуализации и открывает новые горизонты для неинвазивной диагностики [5].

Цель данной работы — разработать методологию, позволяющую анализировать различные параметры сосудов, и провалидировать ее на открытом наборе данных, содержащем оптоакустические 3D-ангиограммы мышцы. Разработанное программное обеспечение (ПО) будет предназначено не только для вышеописанной узкой задачи, но и (после незначительных модификаций), для широкого спектра исследований с ОА-ангиограммами, в том числе диагностики различных сосудистых заболеваний у пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе для вычислений мы использовали набор параметров, упомянутых ранее в статье [15], а также параметры, рассчитанные ПО общего назначения для визуализации и анализа научных данных Amira/Avizo (Thermo Fisher Scientific, США). Также были разработаны новые параметры для описания сегментарных

пространственных характеристик и повышения точности моделей машинного обучения (МО) (табл. 1).

Получение исходных открытых данных

Для ОА ангиографии использовали одну мышь Balb/C nu/nu. Визуализацию сосудов кожи левого бедра животного проводили в камере, заполненной дистиллированной водой. Были получены три технические повторности (рис. 1А) для каждой температуры воды: температура тела (ТТ) (30 °С); комнатная температура (КТ) (23 °С) и температура холодной воды (ХТ) (16 °С). Каждую съемку проводили через 10 мин после погружения бедра мыши в воду для стабилизации температуры ткани и воды.

Для съемки использовали систему ОА мезоскопии (ИПФ РАН, Россия), основанную на диодном лазере ONDA532 (длина волны — 532 нм). УЗ-сигналы собирались с помощью сканирующего модуля, размещенного в герметичной иммерсионной камере с дистиллированной водой. При сканировании диапазон составлял 10 мм по обеим осям, шаг — 20 мкм, временной интервал — около 5 мин, глубина детекции сигнала — до 3 мм (рис. 1Б). Полученные сигналы были преобразованы в ангиографические трехмерные наборы данных с помощью алгоритмов реконструкции и деконволюции. Трехмерные ангиографические изображения обрабатывали с помощью инструмента SKYQUANT 3D [15].

Детальная информация о проведенном эксперименте доступна в предыдущей публикации, где подробно описаны объект, методы и оборудование для получения изображений [15].

Описание исходных открытых данных

Полученный набор данных содержит 16 619 сегментов сосудов с девятью количественными параметрами для каждого сегмента (на базе которых были выведены и рассчитаны девять новых дескрипторов (табл. 1) и 11 количественными параметрами для каждого изображения. Экспериментальный дизайн [15] включал:

ХТ (16 °С): три изображения, 10 418 сегментов;

КТ (23 °С): три изображения, 4663 сегмента;

ТТ (30 °С): три изображения, 1538 сегментов.

Для всех последующих операций исходный датасет разделен на тренировочный, тестовый и валидационный соответственно 60%, 25% и 15% (random seed = 42). Для кластеризации на основе МО были сохранены параметры индивидуальных сегментов, в то время как параметры индивидуальных изображений были использованы для описательной статистики и контроля качества, описанных ранее [15].

Все параметры были стандартизированы путем удаления среднего значения и масштабирования до единичной дисперсии с использованием статистики, вычисленной только на обучающих выборках; то же аффинное преобразование применяли к проверочным/тестовым разбиениям для предотвращения утечки информации.

Неконтролируемая кластеризация на основе центраида и плотности

До перехода к более сложным кластеризаторам была получена карта проекций многомерных объектов с помощью нелинейного метода снижения размерности UMAP (Uniform

Таблица 1. Параметры сосудов, разработанные нами и рассчитанные в данной работе для описания характеристик сосудистых сегментов и их положения в области изображения

Параметр	Расчетная формула	Описание
Segment Z	Исходный параметр, рассчитанный автоматически в ПО Amira/Avizo	Средняя глубина залегания центра сегмента s
Weighted Segment MeanRadius perSegment (a.u.)	$\bar{R}_{ij_{seg}}^{(\omega)} = \frac{\bar{R}_{ij_{seg}} \cdot L_{i_{seg}}}{\sum_{i=0}^{N_j} L_{i_{seg}}}$ $\bar{R}_{ij_{seg}} : \text{ср. радиус } i_{seg} \text{ изображения } j;$ $L_{i_{seg}} : \text{извитая длина сегмента}$	Взвешенное на извитую длину сегмента или извитость сегмента значение среднего радиуса, рассчитанное для каждого сегмента сосуда
Weighted Segment Volume perSegment (a.u.)	$V_{ij_{seg}}^{(\omega)} = \frac{V_{ij_{seg}} \cdot L_{i_{seg}}}{\sum_{i=0}^{N_j} L_{i_{seg}}}$ $V_{ij_{seg}} : \text{ср. радиус } i_{seg} \text{ изображения } j;$ $L_{i_{seg}} : \text{извитая длина сегмента}$	Взвешенное на извитую длину сегмента значение объема, рассчитанное для каждого сегмента сосуда
Параметры, отражающие давление окружающих тканей на сосуды		
Linearity	$Linearity = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\max(\lambda_1, \epsilon)}$	Оценивает «нитевидность» сегмента, значения, близкие к 1, соответствуют вытянутым, «стержневым» структурам
Planarity	$Planarity = \frac{\lambda_2 - \lambda_3}{\max(\lambda_1)}$	Оценивает «ленточность» (двумерность объекта). Высокие значения характерны для геометрий, распластанных в плоскости
LinearityScore	$Linearity_{score} = \frac{\lambda_1 - \lambda_2}{\tau}$	Нормированные метрики устойчивые к общему масштабу Tensor. В практических данных LinearityScore + PlanarityScore + ScatteringScore ≈ 1
PlanarityScore	$Planarity_{score} = \frac{2 \cdot (\lambda_2 - \lambda_3)}{\tau}$	
ScatteringScore	$Scattering_{score} = \frac{3 \cdot \lambda_3}{\tau}$	
VerticalityScore	$Verticality_{score} = v_{1z} \in [0, 1]$	Косинус угла между главной осью сегмента и осью Z
VerticalityAngle (rad)	$Verticality_{Angle} = \arccos \in [0, \pi/2]$	Угол к оси Z в радианах

Manifold Approximation and Projection) с параметрами n_neighbors = 15 и min_dist = 0,1.

После оценки визуальной разделимости данных был применен метод K-means для оптимизации дисперсии внутри кластера.

Для фиксации кластеров произвольной формы и явного отделения «шума» от «ядра» применялся метод DBSCAN.

Чтобы уменьшить коллинеарность и шум, сохранив при этом максимальную дисперсию, мы применили метод главных компонент (PCA) с выделением пяти главных компонент.

После PCA были повторно проведены K-means и DBSCAN, а также проведено сравнение внутренних метрик оценки кластеризации.

Контролируемая классификация

Для проверки разделяемости данных контролируемые классификаторами мы выбрали три дополнительных

модели, охватывающих линейно-нелинейные и генеративно-дискриминационные семейства.

1. CatBoost — градиентный бустинг, который последовательно строит деревья решений, чтобы минимизировать функцию потерь и улучшить качество модели.

2. SGDClassifier — стохастический подход обучения методом градиентного спуска, который поддерживает функции потерь и штрафы для классификации.

3. Logistic Regression Softmax — адаптация функции логистической регрессии под многоклассовые данные.

Мы использовали стратегию кросс-валидации при подготовке набора данных со всей предварительной обработкой. В качестве метрик были использованы точность, общая точность, сбалансированная точность, логарифмическая функция потерь Llog, коэффициент корреляции Мэттьюза (MCC), каппа Коэна (Cohen's κ), а также по ROC-AUC с макро- и микроусреднением и F1-мере с макро- и взвешенным усреднением; дополнительно

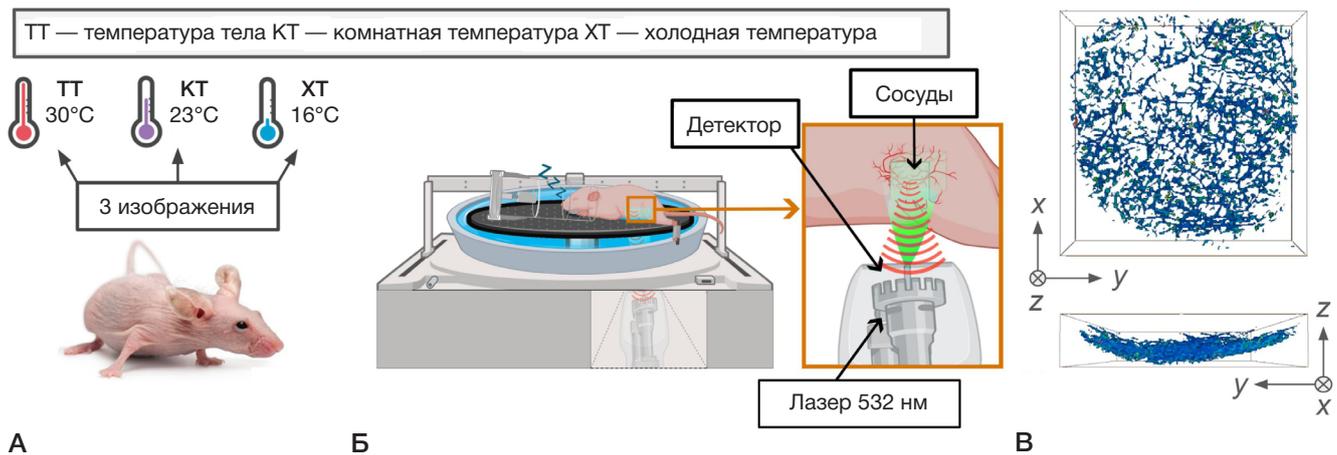


Рис. 1. А. Схематичное представление экспериментального дизайна. Б. Схематичное изображение экспериментальной установки. В. Изображение в анализируемой координатной системе. Модифицировано из [15]

представлены матрицы ошибок, нормализованные по истинным классам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Снижение размерности методом UMAP

Для визуализации многомерной структуры данных был применен метод UMAP.

UMAP-визуализация продемонстрировала четкое разделение данных на три кластера, соответствующих трем температурным условиям эксперимента (рис. 2). Наиболее компактным оказался кластер XT (16 °C), что указывает на выраженные и однородные изменения архитектуры сосудистого русла в условиях гипотермии. Кластер KT (23 °C) занял промежуточное положение между двумя другими группами, в то время как кластер TT (30 °C) продемонстрировал большую дисперсию точек, свидетельствующую о вариабельности сосудистых характеристик в физиологических условиях.

Неконтролируемая кластеризация

Для оценки эффективности неконтролируемых методов МО в задаче разделения температурных состояний были применены алгоритмы DBSCAN и K-Means как с предварительной обработкой данных PCA, так и без нее (табл. 2).

Анализ результатов показал, что применение PCA не привело к существенному улучшению качества кластеризации. Алгоритм DBSCAN продемонстрировал более высокую точность (0,626) и коэффициент силуэта (0,632) по сравнению с K-Means, однако показал низкие значения макро-усредненной F1-меры ($F1_{macro}$) (0,259), что указывает на несбалансированное распознавание классов. K-Means, напротив, обеспечил лучший баланс между классами ($F1_{macro} = 0,367$), но с меньшей общей точностью (0,524). Крайне низкие значения скорректированного индекса Ранда ($ARI < 0,015$) и нормализованной взаимной информации ($NMI < 0,02$) для обоих алгоритмов свидетельствуют о слабом соответствии полученных кластеров истинным температурным группам при использовании неконтролируемых подходов.

Несмотря на многоэтапную подготовку, внутренние метрики оценки кластеризации продемонстрировали недостаточную согласованность и стабильность для последующей интерпретации.

Контролируемая классификация

Классификация моделью Catboost

Для решения задачи контролируемой классификации температурных состояний был применен градиентный бустинг на решающих деревьях в реализации Catboost. Результаты классификации представлены на рис. 3Б.

Модель Catboost продемонстрировала исключительно высокую эффективность в задаче классификации температурных состояний сосудистой сети. Общая точность составила 98,9%, сбалансированная точность — 98,5%, что указывает на корректную работу модели даже с учетом различного количества наблюдений в классах. Площадь под ROC-кривой, превышающая 0,999 для всех вариантов усреднения, свидетельствует о практически идеальной разделимости классов в пространстве параметров.

Наилучшая полнота классификации ($recall = 0,997$) была достигнута для группы XT, что согласуется с результатами UMAP-анализа, показавшими наибольшую компактность и обособленность данного кластера. Группа TT показала максимальную точность ($precision = 0,997$), однако несколько меньшую полноту (0,985). Наименьшая полнота наблюдалась для группы KT (0,971), что может быть связано с переходным характером данного состояния между гипо- и нормотермией.

Классификация моделью SGDClassifier

Модель SGDClassifier показала устойчивую работу на тестовой выборке (табл. 3): общая точность составила 95,7%, а сбалансированная — 95,1%, $F1_{macro}$ — 0,960, $F1_{weighted}$ — 0,956. Коэффициенты согласия также высокие ($MCC = 0,917$; $Cohen's\ k = 0,915$), что позволяет судить о надежной согласованности предсказаний выше случайного уровня. Площадь под ROC-кривой высокая ($macro-AUC = 0,988$; $micro-AUC = 0,994$), однако она все же уступает нелинейной модели градиентного бустинга; логарифмические потери равные 0,176 указывают на более консервативную калибровку вероятностей в сравнении с моделью Catboost.

Очень высокая полнота ($recall = 0,997$) и очень высокая точность ($precision = 0,994$) была показана для группы TT ($F1 = 0,997$), что говорит о четкой отделимости этого состояния в пространстве всех параметров. Для группы XT

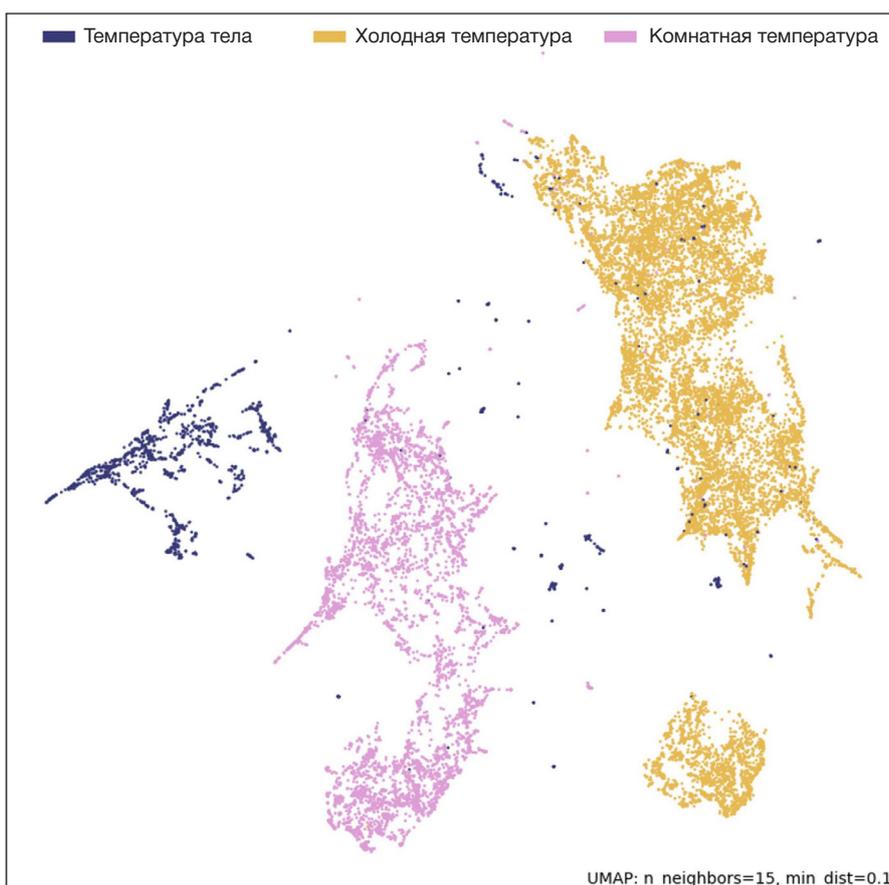


Рис. 2. UMAP-кластеризация исходных данных

модель продемонстрировала рекордную чувствительность ($\text{recall} = 0,995$) одновременно с умеренно сниженной точностью ($\text{precision} = 0,940$; $F1 = 0,967$). Наибольшие сложности кластеризации, как и в предыдущем случае, показаны для группы КТ: несмотря на высокую точность ($\text{precision} = 0,988$) полнота показана ниже ($\text{recall} = 0,857$; $F1 = 0,918$), что указывает на более частые ошибки классификации объектов этой группы и переносу в соседние группы, преимущественно в группу ХТ. Такой эффект типичен для линейных разделителей в случае переходного характера класса.

Классификация моделью логистической регрессии

Модель логистической регрессии, как и Catboost продемонстрировала качество, близкое к предельному на тестовой выборке (табл. 3). Площадь под ROC-кривой близка к идеальной ($\text{ROC-AUC}_{\text{macro}} = 0,99983$; $\text{ROC-AUC}_{\text{micro}} = 0,99987$), в то время как низкие логарифмические потери ($L_{\log} = 0,033$) указывают на хорошую калибровку вероятностей — успешнее по сравнению с остальными линейными и бустинговыми моделями.

Таблица 2. Полученные метрики неконтролируемой кластеризации

Метрика	K-Means	DBSCAN	K-Means (PCA)	DBSCAN (PCA)
accuracy	0,524	0,626	0,524	0,626
$F1_{\text{macro}}$	0,367	0,259	0,367	0,259
silhouette	0,326	0,632	0,333	0,628
ARI	0,014	0,005	0,014	0,004
NMI	0,017	0,002	0,017	0,001

Для группы ТТ показаны крайне высокие значения полноты ($\text{recall} = 0,996$) при очень высокой точности ($\text{precision} = 0,998$; $F1 = 0,999$), что свидетельствует о хорошей отделимости этого состояния. Для группы ХТ качество также близится к идеальному ($\text{precision} = 0,999$; $\text{recall} = 0,997$; $F1 = 0,998$); это означает, что модель практически не допускает ошибок в классификации сегментов из изображений группы ХТ. Наибольшее снижение наблюдается у группы КТ: $\text{precision} = 0,993$, $\text{recall} = 0,996$, $F1 = 0,995$. Это говорит о редких ложноположительных предсказаниях в пользу группы КТ для пограничных объектов.

Оценивая значимость параметров для трех моделей, удалось выявить два стабильных высоко значимых класса (рис. 3А): топологические (известность, вертикальность/планарность, нормализованная рассеянность, линейность) и геометрические (радиусы, длины, объем, координата сегмента по оси Z). Важно отметить, что линейные модели (SGDClassifier и логистическая регрессия) строят решения в основном на основании топологических параметров.

Матрица ошибок (рис. 3Б) позволяет детально оценить паттерны неправильных классификаций для трех моделей.

Таблица 3. Метрики оценки качества моделей контролируемой классификации

Метрика	Catboost	LogisticRegression	SGDClassifier
accuracy	0,989	0,997	0,957
balanced accuracy	0,985	0,998	0,951
L_{log}	0,108	0,033	0,176
MCC	0,979	0,994	0,917
Cohen's κ	0,979	0,994	0,915
ROC-AUC _{macro}	0,999	0,999	0,988
F1 _{macro}	0,988	0,997	0,96
ROC-AUC _{micro}	0,999	0,999	0,994
F1 _{weighted}	0,989	0,997	0,956

Для логистической регрессии можно отметить значимость извитости (рис. 3А), вклад которой на порядок превосходит вклад остальных параметров. Меньшие, но стабильные вклады дают нормализованная вертикальность, нормализованная линейность, планарность, угол вертикальности, нормализованная рассеянность и линейность (порядка 0,28–1,07). Масштабные параметры — средние радиусы, взвешенные по длине/извитости средние радиусы, извитая и прямая длина, объем и взвешенный объем, а также координата сегмента по оси Z — имеют практически нулевую важность.

SGDClassifier повторяет такой же линейный паттерн весов: максимальный вклад вносится параметром извитости, далее следуют нормализованная вертикальность, планарность, угол вертикальности, нормализованная рассеянность и линейность; геометрические параметры остаются близкими к нулю.

В отличие от линейных моделей, модель Catboost показывает другую иерархию параметров: максимальную значимость имеют взвешенный на извитую длину средний радиус, объем и извитая длина. Топологические параметры, такие как извитость, вносят второстепенный вклад.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стандартным подходом для анализа результатов ОА-визуализации является применение методов ИИ [13]. В качестве примера можно привести работу, авторы которой для повышения качества изображений, искаженных артефактами, использовали нейронную сеть U-Net. Они обучили модель на гибридном наборе данных, включавшем симуляции, фантомы и изображения поперечного сечения мышей *in vivo*. Обученная сеть эффективно удаляла артефакты даже при шестикратной недостаточной дискретизации исходных данных. Валидация на экспериментальной установке подтвердила, что алгоритм успешно справляется с задачей, значительно повышая качество изображений [14]. Но при этом стоит учесть, что основным ограничивающим фактором для использования методов искусственного интеллекта является количество анализируемых данных [16]. В нашей работе, в отличие от вышеупомянутых, удалось обойти ограничение по количеству данных за счет применения гибридного подхода: фильтрация изображений и извлечение анализируемых параметров сосудов производится модифицированным пайплайном SKYQUANT-3D [15], не использующим методы МО, но дальнейший анализ проведен с использованием различных МО-классификаторов и кластеризаторов.

Эффективность методологии пайплайна SKYQUANT -3D уже была подтверждена в тестах на сосудистом фантоме, преคลินิกском и клиническом экспериментах [15].

Наиболее важным этапом в анализе ОА-ангиограмм является выбор и подсчет анализируемых параметров сосудов. Так, было получено 64 параметра микрососудистого русла, характеризующих кровенаполнение сосудов, изменение их геометрической конфигурации, ветвление, пространственную локализацию и другое [17]. Авторы исследования использовали классификатор на основе случайного леса для отбора параметров, чтобы выделить наиболее значимые биомаркеры из первоначальных 64 параметров. Сократив набор данных до 32 ключевых показателей, они смогли сосредоточиться на самых информативных параметрах для дифференциации здоровых добровольцев от пациентов с диабетом, подтверждая тем самым важность отбора значимых параметров сосудов для дальнейшего анализа [17].

Проведена визуальная оценка таких параметров сосудов как диаметр и извитость, что позволило эффективно различать пациентов с посттромботическим синдромом и здоровых добровольцев [18]. Проанализированы радиусы сосудов, длины и извитость в различных вариациях [15]. Это дало возможность охарактеризовать изменения в сосудах экспериментального животного в температурном тесте, а также изменения в сосудах здорового добровольца в процессе позиционного теста [15]. В нашей работе использованы параметры из статьи [15], и дополнены схожими с упомянутыми в работе [17] параметрами ветвистости и пространственной локализации. Также отдельного внимания заслуживают уникальные параметры планарность, вертикальность и линейность сосудов, указывающие на изменения микроциркуляторного русла вследствие перераспределения жидкости. В данном эксперименте перераспределение жидкости в теле экспериментального животного связано с температурными изменениями, однако схожие процессы могут происходить у человека как результат развития сосудистого заболевания, например хронической венозной недостаточности [19].

Полученные нами значимости параметров отражают изменения в сосудах, вызванные охлаждением, ранее показанные другими авторами. Охлаждение вызывает расширение мелких периферических сосудов, приводя к тому, что через них проходит больший объем крови, содержащей гемоглобин — основной источник контраста в оптоакустике [20–22]. Это делает их «видимыми» для системы визуализации. Общее увеличение объема крови в исследуемой области является прямым следствием процесса вазодилатации. Периферическая сосудистая

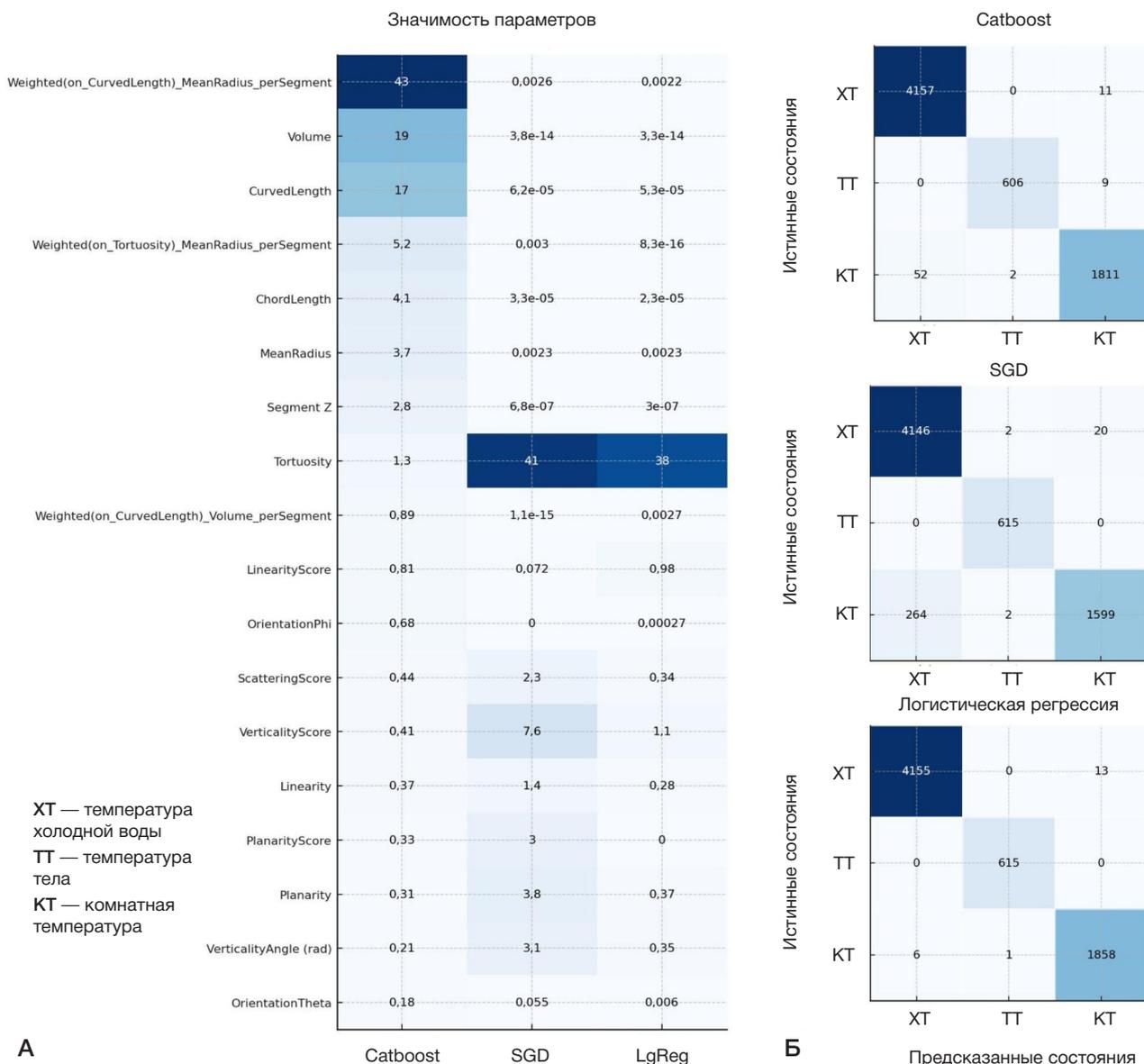


Рис. 3. Характеристики обученных МО моделей: Catboost, SGDClassifier, LogisticRegression. **А.** Вес параметров для индивидуальных сегментов сосудов. **Б.** Матрицы ошибок для трех моделей

сеть по своей природе является более извилистой и разветвленной, чем магистральные сосуды, поэтому ее проявление на изображении ведет к увеличению среднего показателя извилистости [20–22]. Таким образом, эффективность классификации объясняется существующими биологическими эффектами. Стоит отметить, что многие компоненты анализа универсальны для животного и человека, что позволяет внедрить разработку в клиническую практику.

Выводы

В данной работе рассчитаны и проанализированы количественные параметры сосудов, позволяющие описывать состояние микроциркуляторного русла. Были сравнены различные методы МО для определения разных температурных состояний экспериментального животного. Наибольшую эффективность показали методы

контролируемой классификации, их точность близка к абсолютной. Наибольшую успешность показали модели Catboost и логистическая регрессия как учитывающие наиболее значимые физиологические параметры. Далее выбор между моделями должен осуществляться в каждом конкретном случае в зависимости от специфики распределения параметров. Вес параметров отражает реальную физиологию изменений сосудов. Разрабатываемая в ходе данного исследования методология в перспективе поможет не только эффективно различать экспериментальные состояния, но и дифференцировать между собой и от нормы патологические изменения сосудов на пациентах с различными заболеваниями. Это даст возможность преодолеть часть ограничений ОА-ангиографии, что позволит более широко внедрить данный метод в клиническую практику и более точно диагностировать изменения сосудов на ранних стадиях заболеваний.

Литература

- Lin L, Wang LV. The emerging role of photoacoustic imaging in clinical oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022; 19: 365–384. DOI: 10.1038/s41571-022-00615-3.
- Neprokin A, Broadway C, Myllylä T, Bykov A, Meglinski I. Photoacoustic Imaging in Biomedicine and Life Sciences. *Life*. 2022; 12: 588. DOI: 10.3390/life12040588.
- Xia J, Yao J, Wang LHV. Photoacoustic tomography: principles and advances. *PIER*. 2014; 147: 1–22. DOI: 10.2528/pier14032303.
- Karlas A, Fasoula N-A, Paul-Yuan K, Reber J, Kallmayer M, Bozhko D, et al. Cardiovascular optoacoustics: From mice to men — A review. *Photoacoustics*. 2019; 14: 19–30. DOI: 10.1016/j.pacs.2019.03.001.
- Kye H, Song Y, Ninjbadgar T, Kim C, Kim J. Whole-Body Photoacoustic Imaging Techniques for Preclinical Small Animal Studies. *Sensors*. 2022; 22: 5130. DOI: 10.3390/s22145130.
- Wang X, Ku G, Wegiel MA, Bornhop DJ, Stoica G, Wang LV. Noninvasive photoacoustic angiography of animal brains in vivo with near-infrared light and an optical contrast agent. *Opt Lett*. 2004; 29: 730. DOI: 10.1364/ol.29.000730.
- Hu S, Rao B, Maslov K, Wang LV. Label-free photoacoustic ophthalmic angiography. *Opt Lett*. 2009; 35: 1. DOI: 10.1364/ol.35.000001.
- Zhao H, Li K, Yang F, Zhou W, Chen N, et al. Customized anterior segment photoacoustic imaging for ophthalmic burn evaluation in vivo; OEA. 2021; 4: 200017–200017. DOI: 10.29026/oea.2021.200017.
- Li D, Humayun L, Vienneau E, Vu T, Yao J. Seeing through the Skin: Photoacoustic Tomography of Skin Vasculature and Beyond. *JID Innovations*. 2021; 1: 100039. DOI: 10.1016/j.xjidi.2021.100039.
- Luo Y, Wang LV. Photoacoustic Tomography in Cardiovascular Medicine: Innovations in Assessing Hemodynamics and Metabolic Function. *Curr Treat Options Cardio Med*. 2025; 27. DOI: 10.1007/s11936-025-01092-4.
- Leng X, Uddin KMS, Chapman W Jr, Luo H, Kou S, Amidi E, et al. Assessing Rectal Cancer Treatment Response Using Coregistered Endorectal Photoacoustic and US Imaging Paired with Deep Learning. *Radiology*. 2021; 299: 349–358. DOI: 10.1148/radiol.202102208.
- Qiu T, Lan Y, Gao W, Zhou M, Liu S, Huang W, et al. Photoacoustic imaging as a highly efficient and precise imaging strategy for the evaluation of brain diseases. *Quant Imaging Med Surg*. 2021; 11: 2169–86. DOI: 10.21037/qims-20-845.
- Brown EL, Lefebvre TL, Sweeney PW, Stolz BJ, Gröhl J, Hacker L, et al. Quantification of vascular networks in photoacoustic mesoscopy. *Photoacoustics*. 2022; 26: 100357. DOI: 10.1016/j.pacs.2022.100357.
- Davoudi N, Deán-Ben XL, Razansky D. Deep learning optoacoustic tomography with sparse data. *Nat Mach Intell*. 2019; 1: 453–60. DOI: 10.1038/s42256-019-0095-3.
- Korobov A, Besedovskaia Z, Petrova E, Kurnikov A, Glyavina A, Orlova A, et al. SKYQUANT 3D: Quantifying Vascular Anatomy With an Open-Source Workflow for Comprehensive Analysis of Volumetric Optoacoustic Angiography Data. *Journal of Biophotonics*. 2024; 17. DOI: 10.1002/jbio.202400143.
- Baeza-Yates R. The Limitations of Data, Machine Learning and Us. *Companion of the 2024 International Conference on Management of Data*. ACM; 2024. pp. 1–2. DOI: 10.1145/3626246.3656000.
- Karlas A, Katsouli N, Fasoula N-A, Bariotakis M, Chlis N-K, Omar M, et al. Dermal features derived from optoacoustic tomograms via machine learning correlate microangiopathy phenotypes with diabetes stage. *Nat Biomed Eng*. 2023; 7: 1667–82. DOI: 10.1038/s41551-023-01151-w.
- Nemirova S, Orlova A, Kurnikov A, Litvinova Y, Kazakov V, Ayvazyan I, et al. Scanning optoacoustic angiography for assessing structural and functional alterations in superficial vasculature of patients with post-thrombotic syndrome: A pilot study. *Photoacoustics*. 2024; 38: 100616. DOI: 10.1016/j.pacs.2024.100616.
- Barajas Colón JA, Granados-Romero JJ, Barrera-Mera B, Banegas-Ruiz R, Vargas-Morales JJ, Barrera-Calva E, et al. Chronic venous insufficiency: a review. *Int J Res Med Sci*. 2021; 9: 1808. DOI: 10.18203/2320-6012.ijrms20211928.
- Zhang R, Li X, Balasundaram G, Li B, Qi Y, Santosa A, et al. Hybrid Photoacoustic Ultrasound Imaging System for Cold-Induced Vasoconstriction and Vasodilation Monitoring. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2024; 71: 712–6. DOI: 10.1109/tbme.2023.3301013.
- Chang F, Flavahan S, Flavahan NA. Cooling-induced cutaneous vasodilatation is mediated by small-conductance, calcium-activated potassium channels in tail arteries from male mice. *Physiological Reports*. 2023; 11. DOI: 10.14814/phy2.15884.
- Van den Brande P, De Coninck A, Lievens P. Skin Microcirculation Responses to Severe Local Cooling. *Int J Microcirc*. 1997; 17: 55–60. DOI: 10.1159/000179207.

References

- Lin L, Wang LV. The emerging role of photoacoustic imaging in clinical oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022; 19: 365–384. DOI: 10.1038/s41571-022-00615-3.
- Neprokin A, Broadway C, Myllylä T, Bykov A, Meglinski I. Photoacoustic Imaging in Biomedicine and Life Sciences. *Life*. 2022; 12: 588. DOI: 10.3390/life12040588.
- Xia J, Yao J, Wang LHV. Photoacoustic tomography: principles and advances. *PIER*. 2014; 147: 1–22. DOI: 10.2528/pier14032303.
- Karlas A, Fasoula N-A, Paul-Yuan K, Reber J, Kallmayer M, Bozhko D, et al. Cardiovascular optoacoustics: From mice to men — A review. *Photoacoustics*. 2019; 14: 19–30. DOI: 10.1016/j.pacs.2019.03.001.
- Kye H, Song Y, Ninjbadgar T, Kim C, Kim J. Whole-Body Photoacoustic Imaging Techniques for Preclinical Small Animal Studies. *Sensors*. 2022; 22: 5130. DOI: 10.3390/s22145130.
- Wang X, Ku G, Wegiel MA, Bornhop DJ, Stoica G, Wang LV. Noninvasive photoacoustic angiography of animal brains in vivo with near-infrared light and an optical contrast agent. *Opt Lett*. 2004; 29: 730. DOI: 10.1364/ol.29.000730.
- Hu S, Rao B, Maslov K, Wang LV. Label-free photoacoustic ophthalmic angiography. *Opt Lett*. 2009; 35: 1. DOI: 10.1364/ol.35.000001.
- Zhao H, Li K, Yang F, Zhou W, Chen N, et al. Customized anterior segment photoacoustic imaging for ophthalmic burn evaluation in vivo; OEA. 2021; 4: 200017–200017. DOI: 10.29026/oea.2021.200017.
- Li D, Humayun L, Vienneau E, Vu T, Yao J. Seeing through the Skin: Photoacoustic Tomography of Skin Vasculature and Beyond. *JID Innovations*. 2021; 1: 100039. DOI: 10.1016/j.xjidi.2021.100039.
- Luo Y, Wang LV. Photoacoustic Tomography in Cardiovascular Medicine: Innovations in Assessing Hemodynamics and Metabolic Function. *Curr Treat Options Cardio Med*. 2025; 27. DOI: 10.1007/s11936-025-01092-4.
- Leng X, Uddin KMS, Chapman W Jr, Luo H, Kou S, Amidi E, et al. Assessing Rectal Cancer Treatment Response Using Coregistered Endorectal Photoacoustic and US Imaging Paired with Deep Learning. *Radiology*. 2021; 299: 349–358. DOI: 10.1148/radiol.202102208.
- Qiu T, Lan Y, Gao W, Zhou M, Liu S, Huang W, et al. Photoacoustic imaging as a highly efficient and precise imaging strategy for the evaluation of brain diseases. *Quant Imaging Med Surg*. 2021; 11: 2169–86. DOI: 10.21037/qims-20-845.
- Brown EL, Lefebvre TL, Sweeney PW, Stolz BJ, Gröhl J, Hacker L, et al. Quantification of vascular networks in photoacoustic mesoscopy. *Photoacoustics*. 2022; 26: 100357. DOI: 10.1016/j.pacs.2022.100357.
- Davoudi N, Deán-Ben XL, Razansky D. Deep learning optoacoustic tomography with sparse data. *Nat Mach Intell*. 2019; 1: 453–60. DOI: 10.1038/s42256-019-0095-3.
- Korobov A, Besedovskaia Z, Petrova E, Kurnikov A, Glyavina A, Orlova A, et al. SKYQUANT 3D: Quantifying Vascular Anatomy With an Open-Source Workflow for Comprehensive Analysis of Volumetric Optoacoustic Angiography Data. *Journal of Biophotonics*. 2024; 17. DOI: 10.1002/jbio.202400143.
- Baeza-Yates R. The Limitations of Data, Machine Learning and Us. *Companion of the 2024 International Conference on Management of Data*. ACM; 2024. pp. 1–2. DOI: 10.1145/3626246.3656000.
- Karlas A, Katsouli N, Fasoula N-A, Bariotakis M, Chlis N-K, Omar M, et al. Dermal features derived from optoacoustic tomograms via machine learning correlate microangiopathy phenotypes

- with diabetes stage. *Nat Biomed Eng.* 2023; 7: 1667–82. DOI: 10.1038/s41551-023-01151-w.
18. Nemirova S, Orlova A, Kurnikov A, Litvinova Y, Kazakov V, Ayvazyan I, et al. Scanning optoacoustic angiography for assessing structural and functional alterations in superficial vasculature of patients with post-thrombotic syndrome: A pilot study. *Photoacoustics.* 2024; 38: 100616. DOI: 10.1016/j.pacs.2024.100616.
 19. Barajas Colón JÁ, Granados-Romero JJ, Barrera-Mera B, Banegas-Ruiz R, Vargas-Morales JJ, Barrera-Calva E, et al. Chronic venous insufficiency: a review. *Int J Res Med Sci.* 2021; 9: 1808. DOI: 10.18203/2320-6012.ijrms20211928.
 20. Zhang R, Li X, Balasundaram G, Li B, Qi Y, Santosa A, et al. Hybrid Photoacoustic Ultrasound Imaging System for Cold-Induced Vasoconstriction and Vasodilation Monitoring. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2024; 71: 712–6. DOI: 10.1109/tbme.2023.3301013.
 21. Chang F, Flavahan S, Flavahan NA. Cooling-induced cutaneous vasodilatation is mediated by small-conductance, calcium-activated potassium channels in tail arteries from male mice. *Physiological Reports.* 2023; 11. DOI: 10.14814/phy2.15884.
 22. Van den Brande P, De Coninck A, Lievens P. Skin Microcirculation Responses to Severe Local Cooling. *Int J Microcirc.* 1997; 17: 55–60. DOI: 10.1159/000179207.

ДЕТЕКЦИЯ *SALMONELLA ENTERICA* ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМАЛЬНОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕНОГО ПЕТЛЕВОГО ПРАЙМЕРА

Д. В. Шамовская¹, М. А. Гордукова², М. А. Смертина¹, Е. В. Галеева², И. П. Оскорбин¹, Е. А. Храпов¹, У. А. Боярских¹, М. Л. Филипенко^{1,3}✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Детская городская клиническая больница № 9 им. Г. Н. Сперанского, Москва, Россия

³ Институт трансляционной медицины и биотехнологий, Сеченовский университет, Москва, Россия

Сальмонеллез остается одной из ведущих причин бактериальных кишечных инфекций человека и животных. Молекулярная диагностика радикально трансформировала диагностический ландшафт сальмонеллезной инфекции, однако остается времени- и ресурсозатратной. Изотермическая амплификация ДНК, например, петлевая изотермальная амплификация (LAMP), выполняемая при постоянной температуре, является основой разработки быстрых диагностических тестов, которые могут быть адаптированы к формату point-of-care (PoC) и выполнены в условиях ограниченных ресурсов и вдали от централизованных лабораторий. Целью исследования было разработать и валидировать новый метод детекции *Salmonella enterica* в образцах кала человека методом LAMP, в котором мониторинг результатов амплификации достигается с помощью петлевого флуоресцентно меченого праймера, несущего также внутренний гаситель флуоресценции. Предложенный метод имеет предел обнаружения (LoD 95%) 250 копий на реакцию, чувствительность 86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%) и специфичность — 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%) относительно qPCR, а также показал большую устойчивость к ингибиторам амплификации ДНК в образцах фекалий. Введение разных флуоресцентных меток в петлевые праймеры для FLP-LAMP с разными мишенями потенциально обеспечивает возможность мультиплексирования и одновременного выявления нескольких патогенов, что увеличивает диагностические возможности изотермальной амплификации.

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, LAMP, петлевой флуоресцентный праймер, флуоресцентный зонд, аналитическая валидация, ингибиторы ДНК

Финансирование: исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300671-8.

Вклад авторов: Д. В. Шамовская, М. А. Смертина, Е. А. Храпов — оптимизация и валидация LAMP на клинических образцах; М. А. Гордукова, Е. В. Галеева — сбор клинических образцов и данных пациентов; И. П. Оскорбин — планирование экспериментов LAMP; У. А. Боярских — дизайн праймеров LAMP; М. Л. Филипенко — идея исследования, написание и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИХБФМ СО РАН (протокол № 4 от 25 мая 2022 г.), этическим комитетом при ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ» (протокол № 44 от 19 апреля 2022 г.). Пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Максим Леонидович Филипенко
ул. Проспект Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090, Россия; mfilipenko@gmail.com

Статья получена: 23.11.2025 **Статья принята к печати:** 13.12.2025 **Опубликована онлайн:** 22.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.066

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/>).

DETECTION OF *SALMONELLA ENTERICA* BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA USING A FLUORESCENTLY LABELED LOOP PRIMER

Shamovskaya DV¹, Gordukova MA², Smertina MA¹, Galeeva EV², Oscorbin IP¹, Khrapov EA¹, Boyarskikh UA¹, Filipenko ML^{1,3}✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Speransky City Children's Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russia

³ Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov University, Moscow, Russia

Salmonellosis remains one of the leading causes of bacterial gastrointestinal infections in humans and animals. Molecular diagnostics has dramatically reshaped the diagnostic landscape for Salmonella infection; however, it remains time- and resource-intensive. Isothermal DNA amplification, for example loop isothermal amplification (LAMP), performed at a constant temperature, is the basis for the development of rapid diagnostic tests that can be adapted to the point-of-care (PoC) formats and implemented in resource-limited settings or remote from centralized laboratories. The aim of this study was to develop and validate a novel LAMP-based method for detecting *Salmonella enterica* in human stool samples, wherein amplification results are monitored using a loop primer labeled with a fluorophore and an internal quencher. The proposed method achieves a limit of detection (LoD_{95%}) of 250 copies per reaction, with a sensitivity of 86.84% (95% CI: 71.91–95.59%) and specificity of 96.49% (95% CI: 87.89–99.57%) relative to qPCR, and demonstrates increased robustness against DNA amplification inhibitors present in fecal samples. Incorporation of distinct fluorophores into loop primers for FLP-LAMP targeting different genes could potentially enable multiplexing and simultaneous detection of multiple pathogens, thereby expanding the diagnostic utility of isothermal amplification.

Keywords: *Salmonella enterica*, LAMP, fluorescent loop primer, fluorescent probe, analytical validation, DNA amplification inhibitors

Funding: This work was supported by the Russian state-funded project for the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Grant No. 125012300671-8).

Author contribution: Shamovskaya DV, Smertina MA, Khrapov EA — LAMP assay optimization and validation on clinical samples; Gordukova MA, Galeeva EV — collection of clinical specimens and patient data; Oscorbin IP — experimental design for LAMP assays; Boyarskikh UA — LAMP primer design; Filipenko ML — conceptualization, writing, and editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Ethics Committees of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Protocol No. 4, May 25, 2022) and the City Clinical Hospital for Children No. 9 named after G. N. Speransky, Moscow Healthcare Department (Protocol No. 44, April 19, 2022). All patients provided written informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail L. Filipenko
Prospekt Lavrenteva, 8, Novosibirsk, 630090, Russia; mfilipenko@gmail.com

Received: 23.11.2025 **Accepted:** 13.12.2025 **Published online:** 22.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.066

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/>).

Сальмонеллез — одна из наиболее распространенных антропозоонозных инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями рода *Salmonella*, преимущественно подвидом *enterica* [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируется 93–200 млн случаев сальмонеллеза, провоцирующего острый гастроэнтерит, около 155 000 случаев заканчиваются летальным исходом по всему миру [2]. Таким образом, сальмонеллез является серьезной проблемой общественного здравоохранения в развитых и развивающихся странах.

Диагностика сальмонеллеза подразумевает анализ эпидемиологических и эпизоотологических данных, клинических признаков и патоморфологических изменений, на основании которых можно поставить предварительный диагноз. Окончательно диагноз ставят на основании лабораторных диагностических методов. Прижизненная диагностика сальмонеллеза предполагает использование серологических, молекулярно-генетических и микробиологических методов.

На сегодняшний день в клинической практике для выявления сальмонеллеза «золотым стандартом» является микробиологический способ, а именно бактериологический посев отобранного у пациента материала на селективные питательные среды (например, среду Раппапорта–Василиадиса) [3]. Основные недостатки метода — длительность анализа (48–96 ч), ограничивающая своевременное назначение специфической терапии, а также низкая чувствительность метода при применении антибиотиков пациентом до сбора образца. Микробиологические исследования требуют специализированного помещения, оборудования, высококвалифицированного персонала, обладают низкой производительностью, не позволяя проводить массовый скрининг и эпидемиологический мониторинг.

К экспресс-методам диагностики можно отнести использование аллель-специфичной риал-тайм ПЦР, ИФА (иммуноферментный анализ). Метод количественной АС-ПЦР позволяет существенно сократить время диагностики (до 2–4 ч) и повысить аналитическую чувствительность до 1–10 колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл) [4]. Мишени для АС-ПЦР — гены *invA*, *ttr*, *bcfD* и другие консервативные последовательности, специфичные для *Salmonella* [5]. Однако применение метода ограничено во многих регионах из-за дорогостоящего оборудования (термоциклер реального времени), недостаточной квалификации персонала в КДЛ и довольно высокой стоимости анализа.

Решением для PoC-диагностики (point-of-care diagnostics) стали методы изотермальной амплификации, в частности LAMP (loop-mediated isothermal amplification), разработанная Notomi et al. Диагностика методом LAMP позволяет проводить амплификацию ДНК при постоянной температуре 60–65 °C без необходимости циклического изменения температуры, что свойственно PCR. Для анализа используют термостабильную ДНК-полимеразу (например, большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus*) и высокоспецифичный набор из четырех (реже шести) праймеров, распознающих шесть (или восемь) различных участков целевой ДНК. Это обеспечивает исключительно высокую специфичность амплификации целевого участка ДНК [6]. LAMP обладает рядом преимуществ перед PCR/qPCR: высокую специфичность благодаря использованию шести специфичных последовательностей вместо двух; быстроту

(20–30 мин); высокую устойчивость к ингибиторам амплификации, содержащимся в клинических образцах; отсутствие необходимости в дорогостоящем оборудовании [7]. Различные модификации LAMP активно применяют в разработке «бесприборных» тестов или интегрируют в портативные устройства формата point-of-care для использования в полевых условиях [8].

Для визуализации и мониторинга результатов LAMP предложены различные методы [9]: турбидиметрия, основанная на регистрации помутнения реакционной смеси при образовании магний-пирофосфатного осадка; колориметрические тесты, использующие изменение цвета красителей (pH-зависимые, pH-индикаторы) при изменении концентрации пирофосфата и pH реакционной среды; интеркалирующие флуоресцентные красители (SYTO, SYBR Green1 и др.), которые встраиваются в двухцепочечную ДНК и генерируют флуоресцентный сигнал; различные модификации олигонуклеотидов и их комплексов, несущих флуоресцентные метки (праймеры-зонды, молекулярные маячки, гибридизационные зонды).

Последний подход, а именно использование модифицированных флуоресцентно меченых олигонуклеотидов, представляет наибольший интерес, так как имеет потенциал для мультиплексирования и одновременного выявления нескольких мишеней или контрольных локусов в одной реакции благодаря применению нескольких флуоресцентных зондов с разными типами красителей (FAM, HEX, ROX, Cy5) [8]. Несмотря на это, использование петлевых флуоресцентно меченых праймеров с внутренним гасителем в LAMP остается малоизученным направлением.

Целью настоящей работы было разработать и валидировать новый метод генерации флуоресцентного сигнала при проведении LAMP с использованием петлевого флуоресцентно меченого праймера, несущего также внутренний гаситель флуоресценции (quencher), на модели диагностической амплификации фрагмента гена *bcfD* *Salmonella enterica*. Предполагалось, что применение петлевых праймеров-зондов обеспечит надежный мониторинг амплификации в реальном времени, сопоставимый с методом интеркалирующих красителей, при этом открывая возможности для будущего мультиплексирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка контрольного материала

Фрагмент гена *bcfD* размером 211 нуклеотидов (NC_003197, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*) амплифицировали на геномной ДНК *Salmonella* с использованием праймеров *bcfD*-F3 и *bcfD*-B3 и клонировали в вектор с помощью набора Quick-TA («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Структуру плазмидных клонов подтверждали секвенированием по Сэнгеру с использованием набора BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе ABI 3730 (Applied Biosystems, США) в лаборатории молекулярной диагностики ИХБФМ СО РАН.

Контрольную плазмиду (pBCFD) линейаризовали рестриктазой BamHI и измеряли концентрацию с помощью набора Spectra Q BR («Сесана», Россия). Линейаризованную плазмиду разводили серийно в диапазоне 10^2 – 10^6 копий в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), РНК дрожжей 2,5 мкг/мл и 0,01% NaN₃. Количество копий в разведениях определяли методом цифровой ПЦР (ddPCR) на системе

Таблица 1. Структуры олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов

Название	Последовательность
bcd-FIP	GCACTTTACCGGTACGCTGAATACAGCGGCAATTTCAACCA
bcd-BIP	CGGTCTGGATTTCGACAGGTCAAAGCGATAGCCTGGGGAAC
bcd-F3	CCGGACAACGATTCTGGTA
bcd-B3	CCGACATCGGCATTATCCG
bcd-LF	TACCCCTCCGGCTTTTG
bcd-LB	ACAATGCGTCTTATCGTACG
SLF-RB1H	HEX-TTTTTTACCCCT(T-BHQ1)CCGGCTTTTG
SLB-LB1F	FAM-AAAAACAATGCGTC(T-BHQ1)TATCGTACG
SLB-LB2F	FAM-ACAATGCGTCT(T-BHQ1)ATCGTACG
Slm1	GGCAATTTCAACCATGCAGGC
Slm2	CCAGACCGCTGCCTTTACCG
Slm-PF	FAM-AGCCGGAGGGGTACGAGCG-BHQ1

QX200™ Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, США) согласно инструкции производителя с праймерами Slm1 и Slm2 (600 нМ) и флуоресцентно меченым зондом Slm-PF (200 нМ).

LAMP

Стандартные LAMP-реакции объемом 20 мкл содержали: 1× буфер для полимеразы Gss-Sto (40 мМ Tris-HCl pH 8,9; 10 мМ (NH₄)₂SO₄; 10 мМ KCl; 8 мМ MgSO₄; 2,5% DMSO; 0,1% Triton X-100), 1,5 мМ каждого dNTP, 0,4 мкМ внешних праймеров (F3/B3), 0,3 мкМ петлевых праймеров (LF/LB), 1,6 мкМ внутренних праймеров (FIP/BIP), матрицу ДНК и три единицы полимеразы Gss-Sto (ИХБФМ СО РАН). Для мониторинга флуоресценции использовали либо флуоресцентно меченые петлевые праймеры (SLB-LB1F, SLB-LB2F, SLF-LB1H), либо интеркалирующий краситель SYTO-13 в концентрации 0,5 мкМ. LAMP-реакции проводили в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, США) по следующей программе: 120 циклов амплификации при 60 °С с регистрацией флуоресценции в канале HEX/FAM каждые 15-30 с. Для контроля специфичности применяли электрофорез в 1,8%-м агарозном геле для проверки характерного рисунка LAMP-ампликонов или их отсутствия в отрицательном контроле (данные не приведены). Результаты амплификации оценивали по параметру Tt (time-to-threshold) — времени до пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне среднего значения + три стандартных отклонения от отрицательного контроля.

ПЦР в режиме реального времени (qPCR)

ПЦР-реакции объемом 20 мкл содержали: 1× ПЦР-буфер (64 мМ Tris-HCl pH 8,9; 16 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween-20; 3 мМ MgCl₂; 0,002% NaN₃), 0,6 мкМ праймеров (прямой и обратный) и 0,15 мкМ флуоресцентно меченого зонда (табл. 1), 2 единицы Taq-полимеразы (СибЭнзим, Россия) и матрицу ДНК. Программа включала: активацию Taq-полимеразы при 96 °С в течение 15 мин; далее 45 циклов: денатурация при 95 °С (10 с); отжиг и удлинение при 60 °С (40 с) с регистрацией флуоресценции в каналах FAM и Cy5. Результаты обрабатывали в программе CFX Manager (Bio-Rad).

Оценка предела обнаружения (LoD), клинической чувствительности и специфичности

Предел обнаружения (LoD 95%) оценивали путем варьирования концентрации контрольной плазмиды: 65, 125, 250, 500 и 1000 копий на реакцию, с 20 техническими повторами для каждой концентрации. LoD95% определяли как концентрацию ДНК, при которой позитивная реакция (Tt отрицательного контроля — Tt образца > 10 мин) наблюдалась в ≥ 95% технических реплик.

Клиническую чувствительность и специфичность теста оценивали на 95 образцах ДНК из кала детей, собранных в ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского. В качестве «золотого» стандарта использовали qPCR, направленную на ген bcd. Образцы считали положительными по qPCR, если значение Cq (cycle quantification) было менее 34, что соответствовало установленному для этой системы LoD 95% ≤ 12,5 копий на реакцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн и оптимизация петлевого флуоресцентно меченого праймера

Разработка метода визуализации результатов LAMP с использованием флуоресцентно меченых петлевых праймеров была основана на ранее опубликованной и хорошо охарактеризованной системе олигонуклеотидных праймеров для LAMP, специфичных к фрагменту гена *bcd*. Мы применили концепцию, проверенную в Taq-man-зондах, которые генерируют флуоресцентный сигнал не за счет ферментативного гидролиза, а за счет гибридизации [10]. В свободном состоянии Taq-man зонд образует трехмерную структуру, сближающую флуорофор и гаситель флуоресценции (quencher), что приводит к гашению флуоресцентного сигнала (FRET-эффект). При гибридизации зонда с комплементарной последовательностью мишени зонд становится линейным, расстояние между флуорофором и гасителем увеличивается, что приводит к восстановлению флуоресценции.

На основе этого принципа мы синтезировали серию петлевых флуоресцентно меченых праймеров-зондов для LAMP (табл. 1). Каждый олигонуклеотид содержал: 1) флуорофор (FAM или HEX) на 5'-конце; 2) свободный

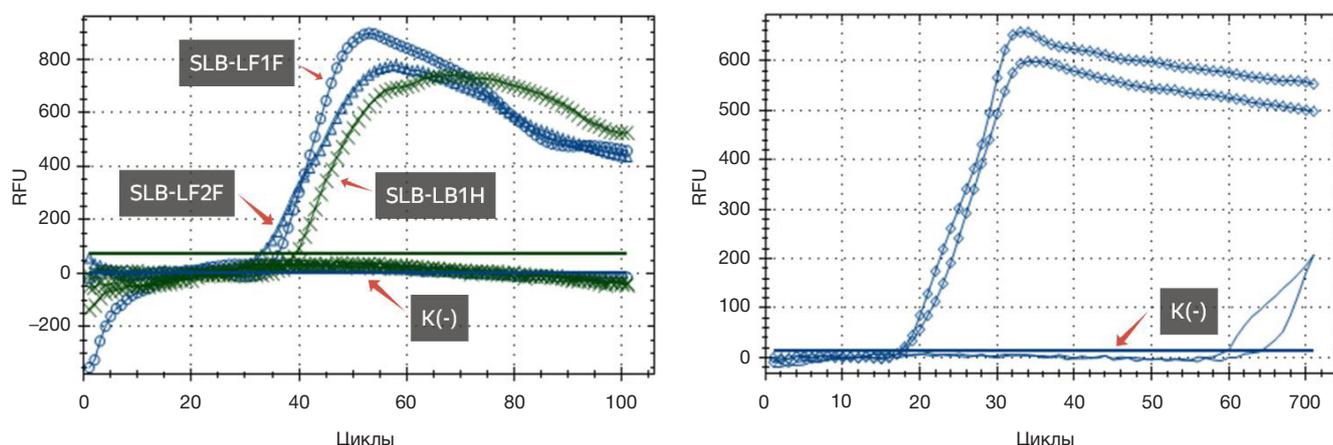


Рис. 1. Кривые накопления продуктов LAMP. Слева: визуализация с помощью флуоресцентных петлевых праймеров-зондов. Справа: визуализация с помощью интеркалирующего красителя SYTO-13

для элонгации 3'-конец; 3) внутренний гаситель BHQ1, введенный через остаток тимина (T-BHQ1), расположенный вблизи 3'-конца.

Дизайн проводили на основе структур «классических» петлевых праймеров bcfD-LF и bcfD-LB. Для трех олигонуклеотидов варьировали расстояние между флуорофором и гасителем: на 5'-конец олигонуклеотида SLB-LB1F добавили 5 остатков дезоксиаденозина (5 dA), а на 5'-конец SLF-LB1H — 5 остатков дезокситимидина (5 dT) для увеличения дистанции FRET-пары. Третий вариант (SLB-LB2F) содержал флуорофор, помещенный непосредственно на нативный 5'-конец олигонуклеотида без удлинения.

Сравнение различных петлевых флуоресцентных праймеров-зондов

При замене классического петлевого праймера (LF или LB) на флуоресцентно меченый петлевой праймер-зонд (в концентрации 0,3 мкМ) в LAMP-реакции с матрицей рBCFD (3000 копий на реакцию) генерировалась четкая кривая нарастания флуоресценции, зависящая от типа синтезированного олигонуклеотида (рис. 1). Все три варианта петлевых праймеров-зондов демонстрировали способность к генерации флуоресцентного сигнала при встраивании в растущий ампликон.

Значения амплитуды разгорания флуоресцентного сигнала были схожими при использовании различных флуоресцентно меченых петлевых праймеров-зондов, однако олигонуклеотид с удлиненной дистанцией между флуорофором и гасителем (SLB-LB1F) демонстрировал большую амплитуду сигнала (~35–40% от базовой флуоресценции), хотя разница кажется незначительной. Как и ожидалось, при использовании интеркалирующего красителя SYTO-13 значение Tt (время до пересечения порога) было существенно меньше (~9–10 мин) по сравнению с петлевыми флуоресцентно мечеными праймерами-зондами (~16–19 мин), что объясняется большим количеством молекул красителя, связывающихся с ампликоном.

Увеличение концентрации петлевого флуоресцентно меченого праймера-зонда SLF-LB1H с 0,3 до 0,6 мкМ не влияло существенно на параметр Tt, но существенно улучшало амплитуду разгорания флуоресцентного сигнала с ~10–15% до 15–35% от базовой флуоресценции смеси до амплификации (рис. 2). Дальнейшее увеличение концентрации не приводило к заметному увеличению

амплитуды, поэтому оптимальной концентрацией была принята 0,6 мкМ для всех последующих экспериментов. Далее для экспериментов использовали петлевой праймер-зонд SLF-LB1H в концентрации 150 нМ.

Определение предела обнаружения

Предел обнаружения (LoD95%) является ключевым аналитическим параметром, определяющим минимальное количество целевой ДНК, которое можно надежно выявить с использованием диагностического теста. Мы оценили LoD для обеих систем визуализации, титруя ДНК-матрицу в диапазоне 65, 125, 250, 500 и 1000 копий на реакцию. Для каждой концентрации проводили 20 технических повторов.

Для системы bcfD-LAMP-SLF-LB1H LoD 95% составил 250 копий/реакция (19 из 20 повторов позитивны, Tt = 20,67 ± 2,60 мин). Для сравнения, при использовании интеркалирующего красителя SYTO-13 LoD был несколько ниже: 125 копий/реакция (20 из 20 повторов, Tt = 17,78 ± 2,07 мин), что соответствует примерно двукратному различию в чувствительности между двумя методами визуализации.

Критическим параметром проведения диагностического LAMP является его продолжительность, так как время амплификации строго ограничено риском образования побочных продуктов в отрицательных контролях (NTC, no template control). Слишком длительная инкубация повышает риск ложноположительных результатов и, как следствие, неправильной клинической интерпретации. Учитывая, что нарастание флуоресценции в отрицательных контролях не

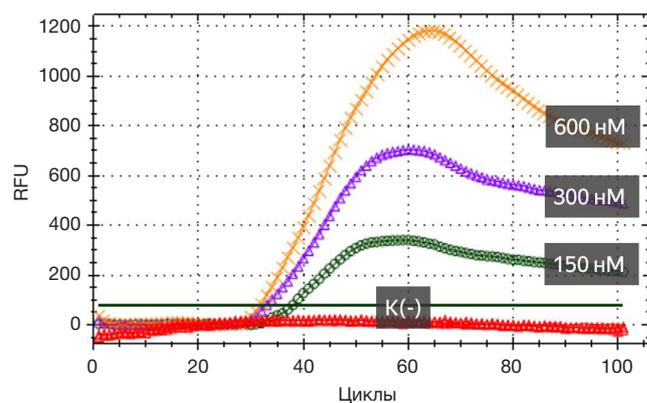


Рис. 2. Влияние концентрации петлевого праймера-зонда SLF-LB1H на амплитуду разгорания флуоресцентного сигнала

Таблица 2. Результаты анализа 95 образцов ДНК из кала детей на наличие *Salmonella*

	qPCR (+)	qPCR (-)	N
LAMP-SLF-LB1H (+)	33	2	35
LAMP-SLF-LB1H (-)	5	55	60
N	38	57	
	qPCR (+)	qPCR (-)	N
LAMP-SYTO13 (+)	36	2	38
LAMP-SYTO13 (-)	2	55	57
N	38	57	

наблюдалось до 60 мин и более, а наибольшее значение Tt для позитивных образцов при концентрации матрицы, равной LoD95%, не превышало 25 мин для bcfD-LAMP-SLF-LB1H, продолжительность проведения диагностического LAMP была установлена в 30 мин.

Тестирование на клинических образцах

Для определения клинической чувствительности и специфичности метода bcfD-LAMP-SLF-LB1H анализировали 95 образцов ДНК из кала детей. В качестве золотого стандарта использовали qPCR, также направленную на ген bcfD с установленным ранее LoD 95% ≤ 12,5 копий/реакция (Cq ~ 34). Образцы считали положительными по qPCR, если Cq был менее 34.

Клиническая чувствительность LAMP-SLF-LB1H составила 86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%), а специфичность 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%). Для сравнения, при использовании интеркалирующего красителя SYTO-13 чувствительность была выше (94,74%), но специфичность существенно не отличалась. Коэффициент капла Коэна, статистический показатель согласованности между двумя классификационными системами, составил 0,844 (95% ДИ: 0,734–0,955) для LAMP-SLF-LB1H в сравнении с qPCR, что соответствует «хорошей» согласованности. Для LAMP-SYTO13 коэффициент капла был выше: 0,912 (95% ДИ: 0,828–0,996), что указывает на «хорошую» согласованность.

Анализ дискордантных результатов и устойчивость к ингибиторам

Основной причиной несовпадения результатов между LAMP-SLF-LB1H и qPCR явилось различие в их LoD: у метода с петлевыми флуоресцентно мечеными праймерами он выше (т. е. чувствительность ниже), чем у qPCR. Анализ дискордантных образцов (положительные по qPCR, отрицательные по LAMP) показал, что их Cq находился в диапазоне 31–33, близком к пороговому значению 34. Возможно, что эти образцы содержали погранично низкие количества целевой ДНК.

Для изучения причин дискордантности два образца, позитивных по LAMP-SLF-LB1H, но негативных по первичному анализу qPCR, повторно анализировали на

qPCR после пятикратного разбавления образцов ДНК. Разбавление применяют для снижения концентрации ингибиторов амплификации, которые могут присутствовать в образцах кала. После разбавления оба образца давали позитивный результат с пограничными значениями Cq (32–33), что дополнительно свидетельствует о большей устойчивости LAMP-SLF-LB1H к ингибиторам амплификации ДНК, содержащимся в фекальных образцах. Этот результат согласуется с известным свойством LAMP проявлять повышенную устойчивость к различным ингибиторам, включая гемоглобин, билирубин, гемоцидин и другие компоненты кала.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерес к методам изотермической амплификации, таким как LAMP, неуклонно растет в связи с их потенциалом для децентрализованной диагностики. К настоящему времени предложено несколько подходов генерации флуоресцентного сигнала в LAMP с использованием различных модифицированных олигонуклеотидов [11]. К ним относятся: молекулярные маячки (molecular beacons), гибридизирующиеся с ампликоном и изменяющие конформацию; гибридизирующиеся зонды (TaqMan-like probes), функционирующие на основе гибридизации без расщепления; интеркалирующие красители (SYBR Green, SYTO), выстраивающиеся в двухцепочечную ДНК; флуоресцентные нуклеотиды (FL-dNTPs), встраиваемые непосредственно в ампликон при синтезе.

В нашем исследовании мы разработали и оценили LAMP-тест с флуоресцентной детекцией сигнала, использующий петлевые флуоресцентно меченые праймеры-зонды, которые непосредственно встраиваются в растущий ампликон. Принципиальное преимущество этого подхода состоит в том, что каждая молекула встроенного в ампликон праймера-зонда генерирует флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству образовавшегося продукта. При встраивании петлевого флуоресцентно меченого праймера в конкатемеры ампликона олигонуклеотид становится линейным, значительно увеличивается расстояние между флуорофором (5'-конец) и гасителем (T-BHQ1), что приводит к восстановлению флуоресценции. Увеличение расстояния между флуорофором и гасителем путем добавления

Таблица 3. Диагностические показатели LAMP-методов в сравнении с qPCR

Показатель	LAMP-SLF-LB1H	LAMP-SYTO13
Чувствительность	86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%)	94,74% (95% ДИ: 82,25–99,36%)
Специфичность	96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%)	96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%)
Коэффициент капла Коэна	0,844 (95% ДИ: 0,734–0,955)	0,912 (95% ДИ: 0,828–0,996)
Позитивное предсказательное значение	94,29%	94,74%
Отрицательное предсказательное значение	91,67%	96,49%

дополнительных нуклеотидов (5 dA или 5 dT) обеспечивает повышение амплитуды флуоресцентного сигнала, хотя эффект был умеренным.

Наиболее близким аналогом нашей системы является FLOS-LAMP (fluorescence of loop primer upon self-dequenching) [12, 13]. В данном подходе флуоресцентный краситель вводится внутрь 3'-области петлевого праймера в определенном нуклеотидном контексте, что вызывает его гашение в несвязанном состоянии, а при включении в двойную спираль ампликона увеличение флуоресценции. Надо отметить, что наш вариант дизайна праймера значительно проще.

На контрольных образцах с известной концентрацией ДНК LAMP-SLF-LB1H продемонстрировал LoD95% 250 копий/реакция, что в два раза выше, чем у LAMP-SYTO13 (125 копий/реакция). Это различие ожидаемо, так как с ампликоном связывается гораздо больше молекул интеркалирующего красителя и генерирует больший флуоресцентный сигнал. Тем не менее, LoD95% 250 копий/реакция для LAMP-SLF-LB1H остается приемлемым для клинической диагностики, так как типичные нагрузки *Salmonella* в образцах кала пациентов с острым гастроэнтеритом значительно превышают эту величину [14]. Более того, дальнейшая более тщательная оптимизация условий амплификации может обеспечить увеличение чувствительности и сокращения времени теста. На панели из 95 клинических образцов ДНК из кала LAMP-SLF-LB1H достигал чувствительности 86,84% и специфичности 96,49% при сравнении с qPCR как золотым стандартом. Дискордантные результаты ($n = 5$ образцов, позитивных по qPCR, но негативных по LAMP-SLF-LB1H) содержали ДНК с Cq 31–33, граничащими с порогом позитивности (Cq = 34), что объясняет различие в результатах и отражает просто разницу в чувствительности двух методов. Интересно, что два образца, которые были позитивны по LAMP-SLF-LB1H, но первично негативны по qPCR, дали позитивный результат при повторном анализе после разбавления, что свидетельствует о наличии ингибиторов амплификации. Изотермическая амплификация, включая LAMP, известна своей повышенной устойчивостью к различным ингибиторам амплификации ДНК, присутствующим в клинических образцах [7]. Также ДНК-полимераза Gss-Sto, содержащая ДНК-связывающий домен, проявляет большую толерантность к ингибиторам по сравнению с нативными ферментами [15]. Наблюдение о большей резистентности к ингибиторам LAMP-SLF-LB1H по сравнению с qPCR согласуется с литературой и имеет практическое значение для клинического применения, так как позволяет снизить требования к подготовке образцов и использовать менее трудоемкие протоколы экстракции ДНК. Безусловно, это должно быть показано более тщательно на большей выборке.

Литература

- Hugas M, Beloel PA. Controlling Salmonella along the food chain in the European Union — progress over the last ten years. *Eurosurveillance*. 2014; 19 (19): 1–4. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.19.20804.
- de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog*. 2012; 8–10: 1002933. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002933.
- Pimenov NV, Laishevtcev AI. Modern methods of epizootic and epidemiological monitoring in the poultry industry on the example of Salmonella infection. *Russ J Agric Socio-Economic Sci*. 2017; 64–4: 257–69. DOI: 10.18551/rjoas.2017-04.33.
- Fu H, Xu W, Huang M, Cong Y. Molecular Detection of Salmonella. *J Food Prot*. 2025; 88–12:100659. DOI: 10.1016/j.jfp.2025.100659.
- Chirambo AC, Nyirenda TS, Jambo N, Msefula C, Kamngona A, Molina S, et al. Performance of molecular methods for the detection of Salmonella in human stool specimens. *Wellcome Open Res*. 2021; 5: 237. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.16305.2.

Потенциальное преимущество использования петлевых флуоресцентно меченых праймеров состоит в возможности применения праймеров с различными флуорофорами (FAM, HEX, ROX, Cy5) для одновременного выявления нескольких мишеней в одной LAMP-реакции. Это особенно важно для диагностики смешанных инфекций или для разработки панельных тестов, выявляющих несколько возбудителей (например, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*). Потенциальная мультиплексная LAMP-система с флуоресцентными петлевыми праймерами может стать основой для разработки надежной point-of-care диагностической платформы для быстрого выявления множественных патогенов [16, 17].

Следует отметить несколько ограничений настоящего исследования. Это относительно небольшой размер клинической панели для надежной валидации диагностического теста. Кроме того, хотя ген *bcdD* считается специфичным для *Salmonella*, необходимо провести перекрестное тестирование на других близкородственных энтеробактериях и кишечных патогенах. Исследование проведено с использованием качественного оборудования (CFX96 Touch, Bio-Rad), что может не отражать реальные условия применения PoC-тестов. К тому же, мы пока намеренно отказались от интенсивной оптимизации теста для оценки устойчивости воспроизведения нашей концепции в рутинных условиях LAMP.

Несмотря на эти ограничения, полученные результаты демонстрируют потенциал петлевых флуоресцентно меченых праймеров как системы визуализации для LAMP. Метод может быть адаптирован к портативным флуоресцентным приборам для использования в PoC-диагностике. Возможность использования различных флуорофоров открывает перспективы для разработки мультиплексных тестов и интеграции в устройства для молекулярной диагностики в условиях ограниченных ресурсов.

ВЫВОДЫ

Нами разработан и валидирован новый дизайн LAMP с использованием петлевого флуоресцентно меченого праймера-зонда, генерирующего флуоресцентный сигнал в режиме реального времени для детекции *Salmonella enterica* на основе гена *bcdD*.

Метод обеспечивает приемлемые аналитические характеристики: LoD95% = 250 копий/реакция, чувствительность 86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%) и специфичность 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%) при сравнении с qPCR. Использование петлевых флуоресцентно меченых праймеров с различными флуорофорами открывает перспективы разработки мультиплексной LAMP для одновременного выявления нескольких патогенов в одной реакции.

6. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28–12: 63e–63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
7. Garg N, Ahmad FJ, Kar S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Curr Res Microb Sci.* 2022; 3: 100120. DOI: 10.1016/j.crmicr.2022.100120.
8. Liu N, Zou D, Dong D, Yang Z, Ao D, Liu W, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep.* 2017; 7–1: 45601. DOI: 10.1038/srep45601.
9. Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog. Dis.* 2018; 15–6: 309–31. DOI: 10.1089/fpd.2018.2445.
10. Zhuang L, Gong J, Li Q, Zhu C, Yu Y, Dou X, et al. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcfD* gene. *Lett Appl Microbiol.* 2014; 59–6: 658–64. DOI: 10.1111/lam.12328.
11. Chen S, Wang F, Beaulieu JC, Stein RE, Ge B. Rapid Detection of Viable *Salmonellae* in Produce by Coupling Propidium Monoazide with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77–12: 4008–16. DOI: 10.1128/AEM.00354-11.
12. Gadkar VJ, Goldfarb DM, Gantt S, Tilley PAG. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci Rep.* 2018; 8–1: 5548. DOI: 10.1038/s41598-018-23930-1.
13. Lee S-Y, Oh S-W. Point-of-Care Diagnostic System for Viable *Salmonella* Species via Improved Propidium Monoazide and Recombinase Polymerase Amplification Based Nucleic Acid Lateral Flow. *Diagnostics.* 2024; 14–8: 831. DOI: 10.3390/diagnostics14080831.
14. Abdullah J, Saffie N, Sjasri FAR, Husin A, Abdul-Rahman Z, Ismail A, et al. Rapid detection of *Salmonella* Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Brazilian J. Microbiol.* 2014; 45–4: 1385–91. DOI: 10.1590/S1517-83822014000400032.
15. Oscorbin IP, Belousova EA, Boyarskikh UA, Zakabunin AI, Khrapov EA, Filipenko ML. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45–16: 9595–10. DOI: 10.1093/nar/gkx645.
16. Pusterla N, Naranatt P, Swadia H, Winfield L, Hartwig A, Barnum S, et al. Multi-Centered Field Evaluation of a *Salmonella* spp. Point-of-Care PCR Assay Using Equine Feces and Environmental Samples. *J Equine Vet Sci.* 2023; 126: 104538. DOI: 10.1016/j.jevs.2023.104538.
17. Zhang X, Zhao Y, Zeng Y, Zhang C. Evolution of the Probe-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays in Pathogen Detection. *Diagnostics.* 2023; 13–9: 1530. DOI: 10.3390/diagnostics13091530.

References

1. Hugas M, Beloel PA. Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union — progress over the last ten years. *Eurosurveillance.* 2014; 19 (19): 1–4. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.19.20804.
2. de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog.* 2012; 8–10: 1002933. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002933.
3. Pimenov NV, Laishevcev AI. Modern methods of epizootic and epidemiological monitoring in the poultry industry on the example of *Salmonella* infection. *Russ J Agric Socio-Economic Sci.* 2017; 64–4: 257–69. DOI: 10.18551/rjoas.2017-04.33.
4. Fu H, Xu W, Huang M, Cong Y. Molecular Detection of *Salmonella*. *J Food Prot.* 2025; 88–12:100659. DOI: 10.1016/j.jfp.2025.100659.
5. Chirambo AC, Nyirenda TS, Jambo N, Msefula C, Kamngona A, Molina S, et al. Performance of molecular methods for the detection of *Salmonella* in human stool specimens. *Wellcome Open Res.* 2021; 5: 237. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.16305.2.
6. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28–12: 63e–63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
7. Garg N, Ahmad FJ, Kar S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Curr Res Microb Sci.* 2022; 3: 100120. DOI: 10.1016/j.crmicr.2022.100120.
8. Liu N, Zou D, Dong D, Yang Z, Ao D, Liu W, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep.* 2017; 7–1: 45601. DOI: 10.1038/srep45601.
9. Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog. Dis.* 2018; 15–6: 309–31. DOI: 10.1089/fpd.2018.2445.
10. Zhuang L, Gong J, Li Q, Zhu C, Yu Y, Dou X, et al. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcfD* gene. *Lett Appl Microbiol.* 2014; 59–6: 658–64. DOI: 10.1111/lam.12328.
11. Chen S, Wang F, Beaulieu JC, Stein RE, Ge B. Rapid Detection of Viable *Salmonellae* in Produce by Coupling Propidium Monoazide with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77–12: 4008–16. DOI: 10.1128/AEM.00354-11.
12. Gadkar VJ, Goldfarb DM, Gantt S, Tilley PAG. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci Rep.* 2018; 8–1: 5548. DOI: 10.1038/s41598-018-23930-1.
13. Lee S-Y, Oh S-W. Point-of-Care Diagnostic System for Viable *Salmonella* Species via Improved Propidium Monoazide and Recombinase Polymerase Amplification Based Nucleic Acid Lateral Flow. *Diagnostics.* 2024; 14–8: 831. DOI: 10.3390/diagnostics14080831.
14. Abdullah J, Saffie N, Sjasri FAR, Husin A, Abdul-Rahman Z, Ismail A, et al. Rapid detection of *Salmonella* Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Brazilian J. Microbiol.* 2014; 45–4: 1385–91. DOI: 10.1590/S1517-83822014000400032.
15. Oscorbin IP, Belousova EA, Boyarskikh UA, Zakabunin AI, Khrapov EA, Filipenko ML. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45–16: 9595–10. DOI: 10.1093/nar/gkx645.
16. Pusterla N, Naranatt P, Swadia H, Winfield L, Hartwig A, Barnum S, et al. Multi-Centered Field Evaluation of a *Salmonella* spp. Point-of-Care PCR Assay Using Equine Feces and Environmental Samples. *J Equine Vet Sci.* 2023; 126: 104538. DOI: 10.1016/j.jevs.2023.104538.
17. Zhang X, Zhao Y, Zeng Y, Zhang C. Evolution of the Probe-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays in Pathogen Detection. *Diagnostics.* 2023; 13–9: 1530. DOI: 10.3390/diagnostics13091530.

ПРОТИВООПИСТОРХОЗНАЯ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА КОРЫ ОСИНЫ (*POPULUS TREMULA L.*) В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Е. А. Перина¹✉, Е. Е. Буйко¹, О. А. Кайдаш¹, Л. В. Ефимова¹, Е. Б. Диксас¹, С. В. Кривошеков¹, А. А. Иванов^{1,2}, В. В. Иванов¹, Е. В. Удуг¹

¹ Центральная научно-исследовательская лаборатория, Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² Общество с ограниченной ответственностью «Биолит», Томск, Россия

Для решения проблемы описторхоза, вызванного трематодой *Opisthorchis felineus*, необходим поиск альтернативных терапевтических решений ввиду рисков развития лекарственной устойчивости и возможных побочных эффектов существующих препаратов, таких как празиквантел. Цель исследования — выявить противоописторхозные и гепатопротекторные свойства экстракта коры осины (*Populus tremula L.*) на примере *in vitro*-моделей. Методом экстракции выделена активная фракция PGF-PT с высоким содержанием фенолгликозидов. Выявлен дозозависимый антигельминтный эффект PGF-PT: индекс относительной подвижности мариит снизился с 98,2% (250 мкг/мл) до 54,5% (2000 мкг/мл, $p < 0,05$), а доля неподвижных особей при концентрации 2000 мкг/мл достигла 30% ($p < 0,05$). Вероятный механизм действия — индуцированное очаговое повреждение клеток поверхностного эпителия (тегумента) паразита. Выявлен выраженный гепатопротекторный эффект PGF-PT, подтвержденный моделью липотоксичности на клетках HepG2: наблюдались нормализация накопления внутриклеточных липидов и подавление окислительного стресса. В модельной системе показана высокая антиоксидантная активность PGF-PT ($IC_{50} = 79,3 \pm 1,0$ мкг/мл). Таким образом, фракция PGF-PT обладает комплексным действием, направленным на элиминацию паразита и коррекцию метаболических нарушений в печени, что открывает перспективы для создания на ее основе новых эффективных препаратов для антигельминтной терапии.

Ключевые слова: *Opisthorchis felineus*, экстракт коры осины, антигельминтная терапия, празиквантел, фенолгликозиды, антиоксиданты, тегумент

Финансирование: средства субсидии на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на проведение научного исследования «720000Ф.99.1.БН62АБ05000 Разработка нового лекарственного средства на основе природного комплекса фенолгликозидов и арабиногалактанов для терапии трематодозов» (Соглашение о предоставлении субсидии федеральному бюджетному или автономному учреждению на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) от 21.01.2025 № 056-03-2025-100, дополнительное соглашение от 04.04.2025г. № 056-03-2025-100/1).

Вклад авторов: Е. А. Перина — воспроизведение описторхозной инвазии, оценка противоописторхозного действия; Е. Е. Буйко — определение гепатопротекторного действия и цитотоксичности экстракта; О. А. Кайдаш — статистическая обработка данных, написание текста статьи, утверждение рукописи для публикации; Л. В. Ефимова — оценка повреждений тегумента мариит; Е. Б. Диксас — воспроизведение описторхозной инвазии; С. В. Кривошеков — синтез экстракта; А. А. Иванов — химический анализ экстракта; В. В. Иванов — разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных; Е. В. Удуг — координация выполнения исследования, утверждение рукописи для публикации.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных центра доклинических исследований центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦДИ ЦНИЛ) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 2 сентября 2023 г.). Работа выполнена в полном соответствии с действующими нормативно-правовыми документами об обращении лекарственных средств, рекомендациями по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований, соблюдением санитарно-эпидемиологических норм.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Александровна Перина
Московский тракт, д. 2, стр. 16, г. Томск, 634050, Россия; catherineperina@gmail.com

Статья получена: 17.10.2025 **Статья принята к печати:** 19.11.2025 **Опубликована онлайн:** 02.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.063

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/>).

ANTI-OPISTHORCHIASIS AND HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF *POPULUS TREMULA* BARK EXTRACT: *IN VITRO* STUDIES

Perina EA¹✉, Buyko EE¹, Kaidash OA¹, Efimova LV¹, Diksas EB¹, Krivoshekov SV¹, Ivanov AA^{1,2}, Ivanov VV¹, Udut EV¹

¹ Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk

² Biolit limited liability company, Tomsk

The problem of opisthorchiasis caused by *Opisthorchis felineus* requires a search for alternative treatments, because the trematode can develop drug resistance and the existing drugs, such as praziquantel, may have undesirable side effects. This study aimed to identify the anti-opisthorchiasis and hepatoprotective properties of *Populus tremula L.* bark extract using *in vitro* methods. The PGF-PT active fraction with a high content of phenol glycosides was obtained through extraction. PGF-PT showed a dose-dependent anti-opisthorchiasis effect: the relative mobility index of maritae decreased from 98.2% at 250 µg/ml to 54.5% at 2000 µg/ml ($p < 0.05$), and the proportion of immobile specimens at 2000 µg/ml was 30% ($p < 0.05$). The probable mechanism of action is focal damage to the cells of the parasite's superficial epithelium (tegument). PGF-PT exhibited a pronounced hepatoprotective effect in a lipotoxicity model based on HepG2 cells, as evidenced by normalized intracellular lipid accumulation and reduced oxidative stress. A high antioxidant activity of PGF-PT was shown in the model system ($IC_{50} = 79.3 \pm 1.0$ µg/ml). Thus, the PGF-PT fraction has a complex effect — eliminating parasites and correcting metabolic disorders in the liver — which makes it a promising basis for new effective anthelmintic drugs.

Keywords: *Opisthorchis felineus*, *Populus tremula* bark extract, anthelmintic therapy, praziquantel, phenol glycosides, antioxidants, tegument

Funding: the project is supported by the state research assignment "720000Ф.99.1.БН62АБ05000 Development of a new drug based on a natural complex of phenol glycosides and arabinogalactanes for the treatment of trematodosis" (Agreement on granting subsidies to a federal budget-supported or autonomous institution as financial support for the state assignment involving provision of public services (implementation of works) of 21.01.2025 No. 056-03-2025-100, supplementary agreement of 04.04.2025 No. 056-03-2025-100/1).

Author contribution: Perina EA — reproduction of opisthorchiasis invasion, assessment of anti-opisthorchiasis effect; Buyko EE — determination of hepatoprotective effect and cytotoxicity of the extract; Kaidash OA — statistical data processing, article authoring, final review and approval of the manuscript; Efimova LV — assessment of damage to the maritae's tegument; Diksas EB — reproduction of opisthorchiasis invasion; Krivoshekov SV — synthesis of the extract; Ivanov AA — chemical analysis of the extract; Ivanov VV — study design and conceptualization, data analysis and interpretation; Udut EV — study coordination, final review and approval of the manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Preclinical Research Center, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Resolution No. 1 of September 02, 2023). The work was performed in full compliance with current drug circulation regulations, guidelines for the use of laboratory (experimental) animals in preclinical (non-clinical) studies, and sanitary and epidemiological standards.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina Alexandrovna Perina
Moskovsky tract, 2, str. 16, Tomsk, 634050, Russia; catherineperina@gmail.com

Received: 17.10.2025 **Accepted:** 19.11.2025 **Published online:** 02.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.063

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/>).

Актуальность проблемы описторхоза, вызываемого трематодами *Opisthorchis felineus* и *Opisthorchis viverrini*, остается чрезвычайно высокой в современной медицине, паразитологии и эпидемиологии [1]. Обширные эндемичные регионы расположены на территории Российской Федерации (Западная и Восточная Сибирь, Приуралье), Восточной Европы и Казахстана, стран Юго-Восточной Азии (Таиланд, Лаос, Вьетнам) [2]. По данным ВОЗ, более 80 млн человек в мире находятся в группе риска, а число инвазированных оценивается в несколько десятков миллионов [3]. Единственным препаратом для этиотропной терапии является празиквантел (PZQ), широкое применение которого создает потенциальный риск селекции резистентных штаммов паразита, что в перспективе может привести к полной утрате эффективности лечения [4]. Кроме того, в последнее время появляется ряд сообщений о возможности повышения риска развития холангиокарциномы при повторных курсах терапии PZQ вследствие массивного высвобождения паразитарных антигенов после приема препарата [4, 5]. В связи с этими обстоятельствами поиск альтернативных лечебных средств с низкой токсичностью и высокой эффективностью приобретает особую актуальность.

Экстракты видов *Populus*, особенно из почек и коры, традиционно применяются благодаря их выраженным противовоспалительным, антиоксидантным и гепатопротекторным свойствам, подтвержденным исследованиями [6, 7]. Так как окислительный стресс и хроническое воспаление играют ключевую роль в развитии осложнений описторхоза, а растительные экстракты с похожей структурой, такие как артезунат, уже зарекомендовали себя при лечении других трематодозов [8], экстракт коры осины *Populus tremula* L. (*P. tremula*) представляется перспективным объектом для изучения. Фармакологическая активность экстрактов коры осины (*Populus tremula* L.) преимущественно обусловлена высоким содержанием фенолгликозидов класса салициноидов [9]. Научные исследования показали выраженную противопаразитарную активность данных фитохимических компонентов в отношении широкого спектра возбудителей печеночных трематодозов (например, *Opisthorchis* spp., *Psilostomum*) и гельминтозов (включая нематодозы и протозойные инфекции типа лямблиоза) [10, 11].

Целью исследования было изучить богатый фенолгликозидами экстракт коры *P. tremula*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования — экстракт коры *P. tremula* с высоким содержанием фенолгликозидов.

На научно-производственном предприятии Биолит из коры *P. tremula*, заготовленной в осенне-зимний период и высушенной в естественных условиях до остаточной влажности 8–10%, методом реперколяции на промышленном экстракторе 2000 L (Hubei weihua machinery co., ltd, Китай) получали жидкий экстракт с соотношением исходного сырья и готового продукта 1 : 1. В качестве экстрагента использовали воду. Полученный жидкий экстракт сгущали в вакуумной системе испарения SX-250 (Hubei weihua machinery co., ltd, Китай) до остаточного содержания влаги 25–40%.

Для получения богатой фенолгликозидами фракции (PGF-PT) в лаборатории контроля качества центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России густой экстракт восстанавливали водной

очищенной в соотношении 1 : 15, перемешивали в течение 30 мин и к полученному раствору добавляли трехкратный (об./об.) избыток 96%-го этилового спирта. После отстаивания осадка при температуре 4 °С в течение 12 ч и декантации надосадочную жидкость центрифугировали при 4000 об./мин в течение 3 мин (Eppendorf 5702, Eppendorf, США). Декантированный раствор объединяли с супернатантом и упаривали на роторном испарителе Rotavapor V-3 (Buchi, Швейцария) с вакуумной насосной станцией PC 500 (Vacuubrand, Германия) при температуре водяной бани 40 °С до 1/10 первоначального объема, после чего высушивали конвекционно. Выход PGF-PT составил 71,65 ± 13,4%. PGF-PT стандартизовали по содержанию фенолгликозида салицина методом ВЭЖХ на хроматографе Ultimate 3000 (Dionex, Thermo, Германия), оснащенном диодно-матричным детектором DAD3000 на колонке Zorbax Eclipse plus C18 3,0 × 150 мм, 3,5 мкм, подвижная фаза А — 0,1% трифторуксусная кислота в воде, подвижная фаза В — ацетонитрил. Режим элюирования — градиентный, объем вводимой пробы составлял 20 мкл, температура термостата колонки — 30 °С. Пик салицина идентифицировали по спектральным признакам: характерные максимумы поглощения при длинах волн 194 и 269 нм, плечо на длине волны 215 нм. Содержание салицина определяли методом внешнего стандарта. Время удерживания пика, соответствовавшего салицину, составляло 7,544 мин. Определение содержания полифенольных соединений (в пересчете на танин) проводили перманганатометрически в соответствии с нормативными документами. По результатам анализа, содержание полифенольных соединений (в пересчете на танин) составило 8,16 ± 0,41 %, салицина — 4,7 ± 0,6 %.

Оценку противоописторхозной активности PGF-PT проводили в ЦДИ ЦНИЛ на взрослых формах печеночного сосальщика *O. felineus* — маритах. В качестве препарата сравнения использовали празиквантел (PZQ, TCI, Япония) в дозе 600 мкг/мл [11]. Заражение экспериментальных животных выполняли по описанной методике [12]. Всего в эксперименте было задействовано 40 самок золотистого хомяка *Mesocricetus auratus* массой 130–150 г SPF-категории, полученных из Федерального государственного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук». Через 3 месяца после заражения животных подвергали эвтаназии в атмосфере CO₂, из гепатобилиарного тракта извлекали мариты, промывали 0,9%-м раствором NaCl, инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч в промывочной культуральной среде RPMI 1640, содержащей 2×пенициллин-стрептомицин [13]. Затем мариты помещали в шестилучный культуральный планшет по 10 особей на лунку со средой для культивирования RPMI 1640, содержащей 1×пенициллин-стрептомицин, 10 г/л глюкозы, 2 г/л бикарбоната натрия.

Растворы фракции PGF-PT и PZQ готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) с последующим разведением в инкубационной среде. Исследуемую фракцию PGF-PT тестировали в конечных концентрациях 250, 500, 1000 и 2000 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовали образцы, инкубированные в среде, содержащей равный объем ДМСО (до 0,5%), что исключало возможное неспецифическое воздействие самого растворителя на метаболизм и поведение марит. Инкубацию марит с веществами проводили в течение 24 ч. в CO₂-инкубаторе.

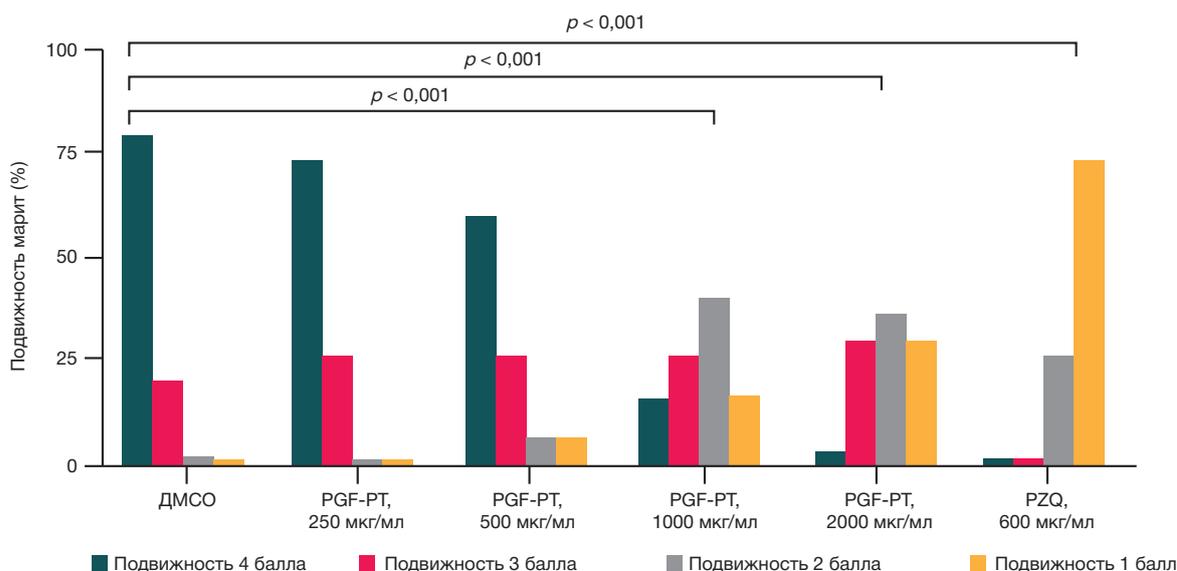


Рис. 1. Влияние фракции PGF-PT на подвижность марит *O. felineus*

Стандартом изучения эффективности перспективных антигельминтных препаратов является тестирование *in vitro*, проводимое с помощью оценки подвижности и морфологии паразитов [10, 11]. Противопаразитарную активность оценивали путем анализа изменения двигательной активности и морфологических изменений тегумента марит под микроскопом NE910 (Ningbo Yongxin Optics Co Ltd, Китай), оснащенный камерой (Digital Sighth 1000, Nikon, Китай). Подвижность определяли визуально по четырехбалльной шкале [14]: 4 — движения очень активны (аналогичны движениям контрольных сосальщиков); 3 — активны (сниженная подвижность по сравнению с контролем, однако все тело еще движется); 2 — сниженная активность (видны только движения присоски); 1 — неподвижные черви. Показатели подвижности в лунках нормализовали относительно показателей контрольной группы.

Относительный индекс подвижности (RM) рассчитывали по формулам [14]:

$$RM \% = \frac{MI_{experiment}}{MI_{control}} \times 100\%$$

$$MI = \frac{\sum n \times Nn}{\sum Nn}$$

где *MI* — индекс подвижности группы червей, *n* — балл подвижности, *Nn* — количество трематод с баллом *n*.

Для определения влияния экстракта на функциональное состояние клеток тегумента печеночного сосальщика выполняли исследование с флуоресцентным интеркалирующим красителем пропидий иодидом (PI), который связывается с ДНК и применяется для окрашивания ядер мертвых клеток. Мариты инкубировали с PI (2 мкг/мл) в течение 20 мин, затем промывали физиологическим раствором. Изображения получали под флуоресцентным микроскопом Leica DM6 (Leica Microsystems GmbH, Германия) [15].

Таблица. Влияние PGF-PT на индекс подвижности марит *O. felineus*

	ДМСО	PGF-PT, 250 мкг/мл	PGF-PT, 500 мкг/мл	PGF-PT, 1000 мкг/мл	PGF-PT, 2000 мкг/мл	PZQ, 600 мкг/мл
MI	3,8	3,7	3,4	2,4	2,1	1,1
RM, %		98,2	89,5	64	54,5	28,5

Гепатопротекторную активность PGF-PT оценивали *in vitro* в модели липотоксичности, индуцированной смесью олеата и пальмитата натрия, на клетках линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 по уровням внутриклеточных липидов и активных форм кислорода (АФК). Содержание липидов оценивали с помощью флуоресцентного красителя нильского красного [16]. В качестве положительного контроля использовали гиполипидемическое соединение гемфиброзил (100 мкМ, Sigma-Aldrich, США). Визуализацию липидных капель проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DM6 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Уровень АФК в клетках измеряли с 2,7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом (ДФХДА) [17]. Безопасные концентрации PGF-PT для использования в данной модели (31,25; 62,5 и 125 мкг/мл) выбрали с помощью теста с витальным красителем нейтральным красным [18].

Для определения вклада прямой антирадикальной активности в способность фракции влиять на уровень АФК в клетках проводили эксперимент в модельной системе с использованием стабильного радикала 1,1-дифенил-2-пикрилгидразида (ДФПГ), как описано ранее [19]. Активность выражали показателем IC₅₀, означающим эффективную концентрацию PGF-PT, при которой восстанавливается 50% свободных радикалов ДФПГ.

Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Для анализа порядковых данных использовали критерий хи-квадрат Пирсона (χ²). Для попарного сравнения групп применяли поправку на множественные сравнения Бонферрони. Количественные данные проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Сравнение средних значений между несколькими независимыми группами проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Статистически значимым считали *p* < 0,05.

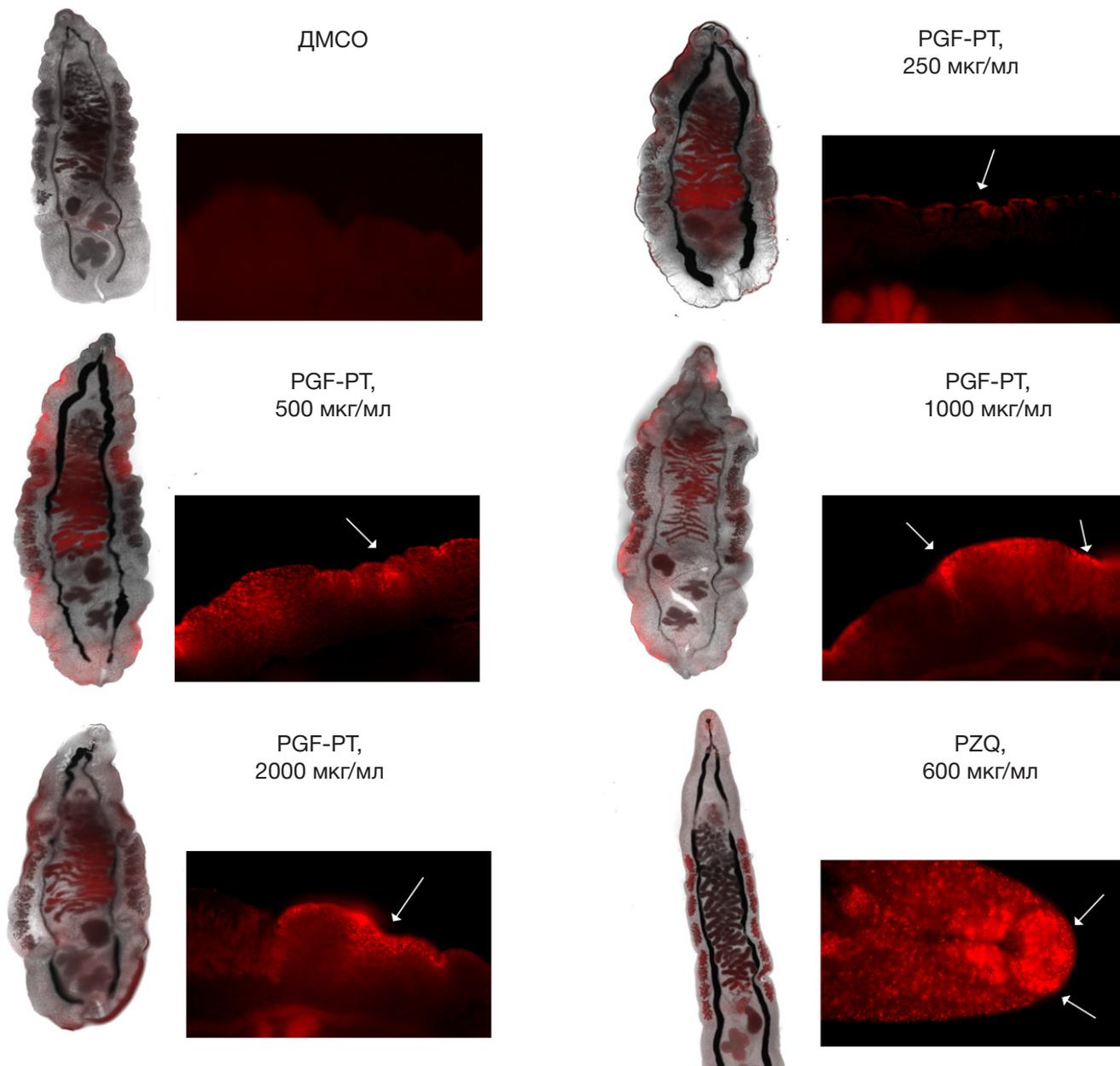


Рис. 2. Оценка повреждения тегумента марит *O. felineus* методом флуоресцентного окрашивания

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фракция PGF-PT оказывала дозозависимый эффект на подвижность марит *O. felineus* (рис. 1).

В контрольной группе наблюдали полную сохранность двигательной активности и целостности покровов марит. Обработка фракцией PGF-PT в концентрации 1000 мкг/мл снижала подвижность 40% взрослых особей до минимального значения (2 балла по шкале подвижности); при этом у 17% паразитов полностью отсутствовала двигательная активность (1 балл по шкале подвижности). При дальнейшем увеличении концентрации PGF-PT до 2000 мкг/мл число полностью неподвижных особей возросло до 30%. Препарат сравнения PZQ в концентрации 600 мкг/мл обеспечивал полную иммобилизацию 73% взрослых особей.

Индекс подвижности паразитов в контрольной группе составил 3,8. По мере повышения концентрации PGF-PT от 250 до 2000 мкг/мл индекс снизился с 3,7 до 2,1. Одновременно относительная подвижность падала с 98,2

до 54,5%. В свою очередь, PZQ подавлял активность паразитов до уровня 28,5%, что провоцировало развитие спастического паралича (таблица).

При оценке целостности тегумента установили, что флуоресцентный краситель PI не проникал в клетки жизнеспособных марит контрольной группы. Флуоресцентное свечение после обработки PZQ локализовалось в областях тегументального синцития. Данные результаты совпадают с литературными источниками, согласно которым у *O. viverrini* PZQ аналогично индуцирует деструкцию и слущивание тегумента [15]. При воздействии PGF-PT в концентрациях 500, 1000 и 2000 мкг/мл наблюдали частичное проникновение PI вглубь тегументального синцития червя на отдельных участках поверхности тела, свидетельствующее о локальных нарушениях клеточной мембраны и потере тканевой целостности (рис. 2).

Таким образом, воздействие PGF-PT вызвало частичную деградацию клеток тегумента, однако не обеспечивало полного функционального разрушения организма паразита и потери подвижности во всех рассмотренных случаях.

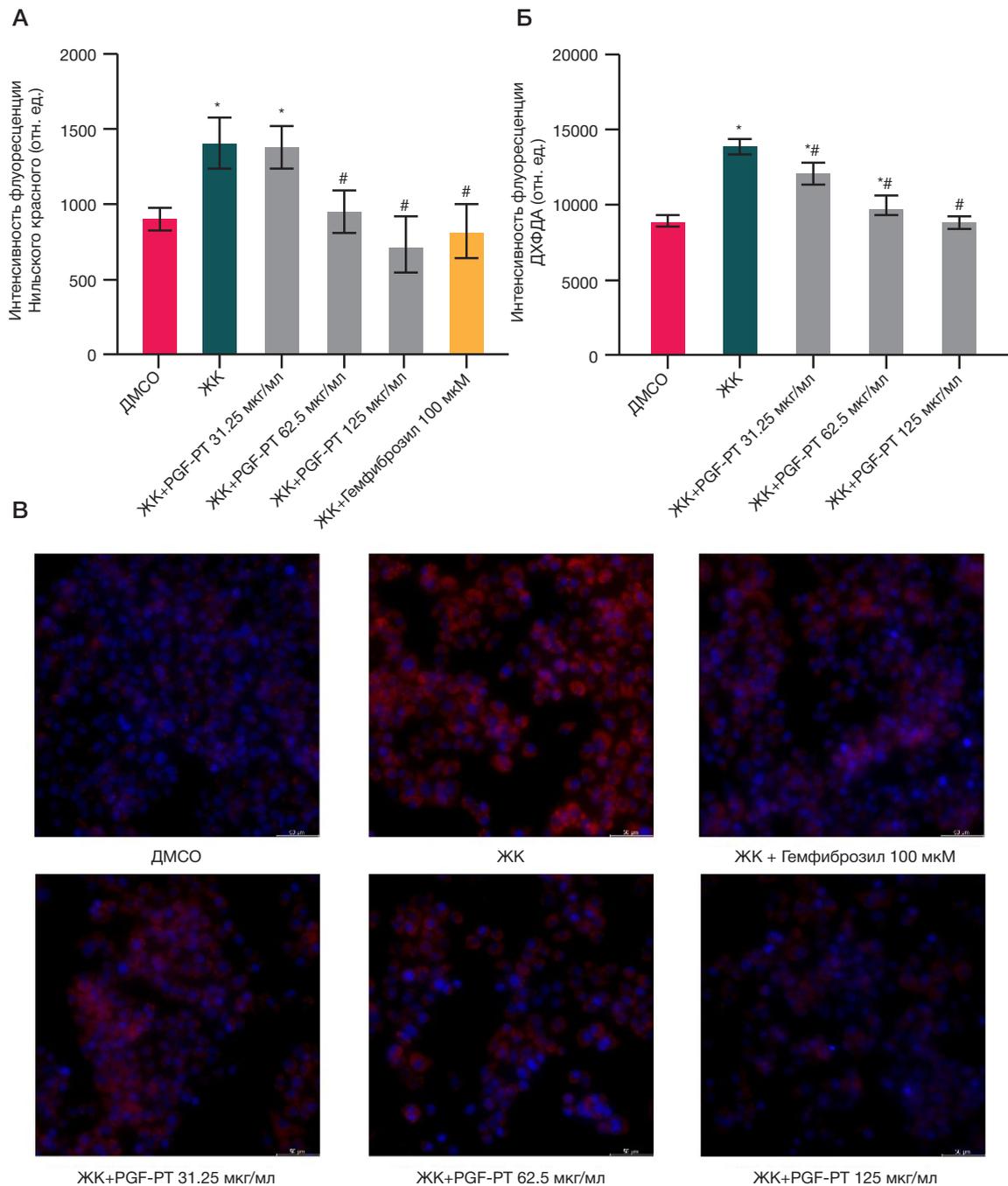


Рис. 3. Гепатопротекторная активность PGF-PT, оцениваемая по уровню внутриклеточных липидов и активных форм кислорода (АФК) в клетках HepG2 после инкубации в среде, содержащей олеиновую (1 мМ) и пальмитиновую (0,5 мМ) кислоты (ЖК): **А.** интенсивность флуоресценции нильского красного (внутриклеточные липиды), **Б.** интенсивность флуоресценции 2,7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (АФК) и **В.** фотографии клеток (увеличение $\times 40$), окрашенных нильским красным и Hoechst 33342 (ядра клеток). Данные представлены как $M \pm SD$. * — отличия от группы ДМСО значимы ($p < 0,05$); # — отличия от группы ЖК значимы ($p < 0,05$)

Применение световой микроскопии подтвердило наличие значительных повреждений поверхностных структур тел мариот после инкубации с высокими концентрациями PGF-PT (1000 и 2000 мкг/мл), проявляющихся в виде массивного слущивания эпителия и отека тегумента (см. приложение).

Инкубация клеток HepG2 в среде с олеиновой и пальмитиновой жирными кислотами (ЖК) приводила к развитию гепатотоксичности. Регистрировали увеличение содержания внутриклеточных липидов на 55% ($p < 0,05$) по результатам оценки интенсивности флуоресценции липофильного красителя (рис. 3А), что согласовывалось с данными микроскопии (рис. 3В).

Интенсивность флуоресценции ДХФДА также возрастала на 57% ($p < 0,05$), что отражало рост уровня АФК в клетках (рис. 3Б).

Фракция PGF-PT в концентрациях 62,5 и 125 мкг/мл вызывала дозозависимое снижение уровня липидов на 32,9% ($p < 0,05$) и 48,9% ($p < 0,05$), и этот эффект был сравним с действием гиполипидемического соединения гемфибросила ($p > 0,05$) (рис. 3А). Вместе с тем исследуемая фракция PGF-PT подавляла окислительный стресс в клетках HepG2, обработанных средой с повышенным уровнем ЖК (рис. 3Б). Внесение фракции PGF-PT в концентрациях 31,25, 62,50 и 125,00 мкг/мл снижало интенсивность флуоресценции внутриклеточного

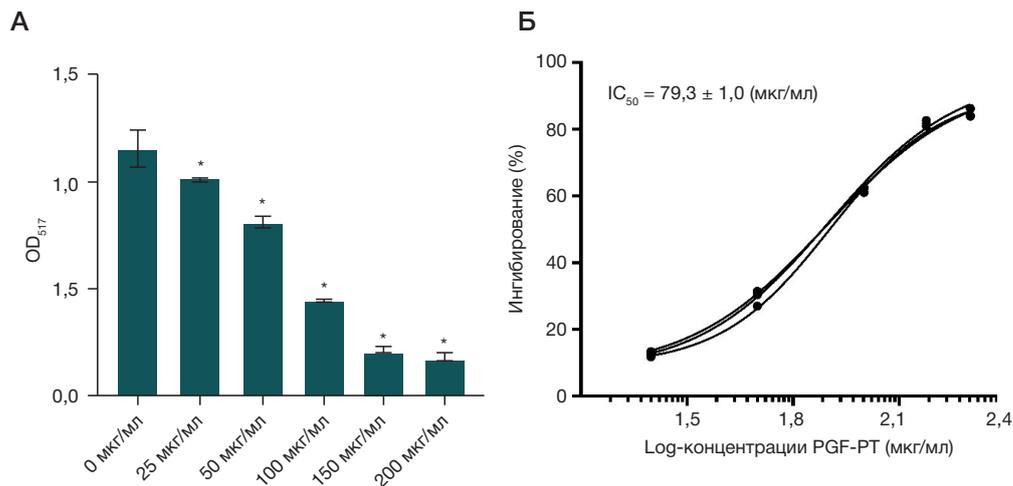


Рис. 4. Влияние фракции PGF-PT на оптическую плотность раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ, 100 мкМ) (А) и полулогарифмическая зависимость эффективности ингибирования реакции с радикалом ДФПГ от концентрации фракции PGF-PT (Б). Данные представлены как $M \pm SD$. * — отличия от контрольной группы (0 мкг/мл) значимы ($p < 0,05$)

зонда на АФК ДХФДА на 12,6% ($p < 0,05$), 28,2% ($p < 0,05$) и 36,2% ($p < 0,05$) соответственно.

Снижение уровня внутриклеточных АФК может быть обусловлено и прямыми антирадикальными свойствами PGF-PT, результаты оценки которых в модельной системе представлены на рис. 4А.

На основании полученных данных проведены расчеты концентрации фракции PGF-PT, обеспечивающей ингибирование 50% свободных радикалов ДФПГ (IC_{50}). Эта величина составила $79,3 \pm 1,0$ мкг/мл (рис. 4Б). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о выраженных антирадикальных и гепатопротекторных свойствах фракции PGF-PT.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты демонстрируют выраженные противоописторхозный и гепатопротекторный потенциалы экстракта коры осины *Populus tremula*, богатого фенолгликозидами (фракция PGF-PT).

Мы обнаружили, что данная фракция вызывает дозозависимое снижение подвижности марит *O. felineus*, причем при максимальной исследуемой концентрации (2000 мкг/мл) полностью утрачивают подвижность 30% особей. Несмотря на то что этот показатель ниже, чем у стандартного препарата празиквантела (73% неподвижных особей), установленное нами снижение подвижности указывает на перспективность дальнейшей разработки препарата на основе PGF-PT.

Микроскопическое исследование подтвердило, что воздействие PGF-PT вызывает частичную деградацию клеток тегумента, что ограничивает функциональные возможности паразита. Однако полного разрушения тегумента и полной остановки подвижности не происходило, что подчеркивает необходимость продолжения исследований для усиления антигельминтного эффекта. Антигены тегумента — многоядерного синцития толщиной около 4 мкм, выполняющего несколько важных функций, включая защиту от иммунных клеток хозяина, являются перспективными кандидатами для разработки антигельминтных препаратов. Интересно, что антигельминтные препараты, обладающие различными механизмами действия, вызывают повреждение тегумента паразитов [11]. Это указывает на то, что препараты, наряду с непосредственным влиянием на молекулярные

мишени, вызывают нарушение поверхности паразита, что приводит к активации антителозависимой клеточной цитотоксичности и является отправной точкой для эффективного иммунного ответа организма хозяина.

Данные о дозозависимом сокращении подвижности марит *O. felineus* и индуцированных очаговых повреждениях тегумента хорошо согласуются с ранее опубликованными исследованиями, в которых сообщалось о выраженной противопаразитарной активности фенолгликозидов растений *Populus spp.* Недавно было описано противоописторхозное действие неочищенных экстрактов *Allium sativum* L. [11] и *Thunbergia laurifolia* Lindl. [20]. В других работах приводятся результаты изучения антигельминтных свойств флавоноида кверцетина, относящегося к классу полифенольных соединений, и выражающиеся в снижении подвижности и повреждении тегумента взрослых форм паразитов [21, 22]. Более мягкий механизм действия может способствовать снижению риска тяжелых иммунопатологических реакций, связанных с массовой гибелью и разрушением паразитов.

Гепатопротекторное действие PGF-PT, проявляющееся в снижении липотоксичности и окислительного стресса в клеточной модели HepG2, подтверждается современными данными о свойствах фенолгликозидов и других биофлавоноидов. Показано, что гепатопротекторный эффект полифенолов не сводится к единому механизму, а является результатом комплексного воздействия, включающего усиление антиоксидантного, метаболического и иммуномодулирующего действия [23]. Это позволяет предполагать, что терапия данным экстрактом не только снижает паразитарную нагрузку, но и защищает печень от повреждений, что особенно важно при хронических формах описторхоза и риске развития холангиокарциномы.

Выводы

Фракция PGF-PT из коры осины *Populus tremula* в экспериментах *in vitro* обладает выраженной антигельминтной активностью против *Opisthorchis felineus*, вызывая дозозависимое снижение подвижности и повреждения тегумента паразита. Кроме того, PGF-PT оказывает гепатопротекторное действие, снижая липотоксичность и окислительный стресс в гепатоцитах. Мягкий режим действия отличает ее от празиквантела, снижая риск иммунопатологических осложнений. Эти данные

подчеркивают потенциал PGF-PT как перспективного компонента для создания новых антиописторхозных препаратов с дополнительным гепатопротекторным эффектом. Несмотря на то что системы *in vitro* обладают значительными ограничениями в адекватном воспроизведении реальной многокомпонентной системы «паразит–

хозяин», они предоставляют важную информацию о базовых механизмах фармакологического действия. Представленные нами результаты служат основанием для дальнейших исследований *in vivo*, направленных на оценку эффективности и безопасности фракции PGF-PT в реальных биологических условиях.

Литература

- Liu L, Lu LD, Yang GJ, Qian MB, Yang K, Tan F, et al. Global, regional and national disease burden of food-borne trematodiasis: projections to 2030 based on the Global Burden of Disease Study 2021. *Infect Dis Poverty*. 2024; 13 (1): 95.
- Fedorova OS, Kovshirina YV, Kovshirina AE, Fedotova MM, Deev IA, Petrovskiy FI, et al. Opisthorchis felineus infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: A review of medical statistics. *Parasitol Int*. 2017; (4): 365–71.
- World Health Organization. Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: World Health Organization, 2020. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/338565>. Accessed 9 July, 2024.
- Lvova MN, Ponomarev DV, Tarasenko AA, Kovner AV, Minkova GA, Tsyganov MA, et al. Curcumin and its supramolecular complex with disodium glycyrrhizinate as potential drugs for the liver fluke infection caused by Opisthorchis felineus. *Pathogens*. 2023; 12 (6): 819.
- Kamsa-Ard S, Luvira V, Pugkhem A, Luvira V, Thinkhamrop B, Suwanrungruang K, et al. Association between praziquantel treatment and cholangiocarcinoma: a hospital-based matched case-control study. *BMC Cancer*. 2015; 15: 776.
- Debbache-Benaid N, Atmani-Kilani D, Schini-Keirth VB, Djebbli N, Atmani D. Pharmacological potential of Populus nigra extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3 (9): 697–704.
- Urbanchik EA, Kurkin VA, Agapov AI. The pharmacognostic study of some species of the genus poplar (Populus L.) growing in the Samara Region. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhya*. 2021; (5–6): 92–97.
- Gouveia MJ, Brindley PJ, Gärtner F, Costa JMCD, Vale N. Drug Repurposing for Schistosomiasis: Combinations of Drugs or Biomolecules. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018; 11 (1): 15.
- Rashmi SP, Yogendra P, Motamarri VNLC, Avijit M, Navneet K, Prabin KT. Discerning the multi-dimensional role of Salicin: bioactive glycoside beyond analgesic: different perspectives. *Current Drug Therapy*. 2024; 19 (7): e221123223716.
- V. Devi Rajeswari. Anthelmintic Activity of Plants: A Review. *Research Journal of Phytochemistry*. 2014; 8: 57–63.
- Sangkam W, Arunsan P, Pechdee P, Boonsuya A, Thanchonngang C, Chatdumrong W, et al. Anthelmintic activity and pathophysiological effect of anthelmintic drugs against carcinogenic liver fluke, Opisthorchis viverrini. *Trop Biomed*. 2024; 41 (2): 196–205.
- Pershina AG, Saitykova IV, Ivanov VV, Perina EA, Demin AM, Shevelev OB, et al. Hemozoin "knobs" in Opisthorchis felineus infected liver. *Parasit Vectors*. 2015; (8): 459.
- Wong Y, Pearson MS, Fedorova O, Ivanov V, Khmelevskaya E, Tedla B. Secreted and surface proteome and transcriptome of Opisthorchis felineus. *Frontiers in Parasitology*. 2023; (2): 1195457.
- Ponomarev D, Lvova M, Mordvinov V, Chidunchi I, Dushkin A, Avgustinovich D. Anti-Opisthorchis felineus effects of artemisinin derivatives: An in vitro study. *Acta Trop*. 2024; 254: 107196.
- Pakharukova MY, Shilov AG, Pirozhkova DS, Katokhin AV, Mordvinov VA. The first comprehensive study of praziquantel effects in vivo and in vitro on European liver fluke Opisthorchis felineus (Trematoda). *Int J Antimicrob Agents*. 2015; 46 (1): 94–100.
- Yao HR, Liu J, Plumeri D, Cao YB, He T, Lin L, et al. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *American journal of translational research*. 2011; 3 (3): 284.
- Zhang M, Lai J, Wu Q, Lai J, Su J, Zhu B. Naringenin induces HepG2 cell apoptosis via ROS-mediated JAK-2/STAT-3 signaling pathways. *Molecules*. 2023; 28 (11): 4506.
- Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008; 3 (7): 1125–13.
- Lee SE, Ju EM, Kim JH. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from Smilax china root. *Experimental & molecular medicine*. 2001; 33 (4): 263–8.
- Pechdee P, Arunsan P, Boonsuya A, Thanchonngang C, Phinsiri S, Rattanapitoon N, et al. Efficacy of Thunbergia laurifoliacrude extracts against carcinogenic liver fluke, Opisthorchis viverrini. *Tropical Biomedicine*. 2025; 42 (1): 65–75.
- Elmahy RA, Radwan NA. In vitro evaluation of the nematocidal efficacy of quercetin on adult toxocara canis. *Acta Parasitol*. 2025; 70 (3): 96.
- Ray MS, Mondal C, Saha S, Mandal S, Lyndem LM. Quercetin: An anthelmintic potential against zoonotic tapeworm Hymenolepis diminuta (Rudolphi, 1819). *J Helminthol*. 2025; (99): e9.
- Brzhozovskiy AG, Semenov SD, Zhrebker AY, Bugrova AE, Yurova MN, Zhernov YV. Hepatoprotective activity of nature-derived polyphenols studied by mass spectrometry based multi-OMICs approach. *Int J Mol Sci*. 2025; 26 (4): 1604.

References

- Liu L, Lu LD, Yang GJ, Qian MB, Yang K, Tan F, et al. Global, regional and national disease burden of food-borne trematodiasis: projections to 2030 based on the Global Burden of Disease Study 2021. *Infect Dis Poverty*. 2024; 13 (1): 95.
- Fedorova OS, Kovshirina YV, Kovshirina AE, Fedotova MM, Deev IA, Petrovskiy FI, et al. Opisthorchis felineus infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: A review of medical statistics. *Parasitol Int*. 2017; (4): 365–71.
- World Health Organization. Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: World Health Organization, 2020. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/338565>. Accessed 9 July, 2024.
- Lvova MN, Ponomarev DV, Tarasenko AA, Kovner AV, Minkova GA, Tsyganov MA, et al. Curcumin and its supramolecular complex with disodium glycyrrhizinate as potential drugs for the liver fluke infection caused by Opisthorchis felineus. *Pathogens*. 2023; 12 (6): 819.
- Kamsa-Ard S, Luvira V, Pugkhem A, Luvira V, Thinkhamrop B, Suwanrungruang K, et al. Association between praziquantel treatment and cholangiocarcinoma: a hospital-based matched case-control study. *BMC Cancer*. 2015; 15: 776.
- Debbache-Benaid N, Atmani-Kilani D, Schini-Keirth VB, Djebbli N, Atmani D. Pharmacological potential of Populus nigra extract as antioxidant, anti-inflammatory, cardiovascular and hepatoprotective agent. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013; 3 (9): 697–704.
- Urbanchik EA, Kurkin VA, Agapov AI. The pharmacognostic study of some species of the genus poplar (Populus L.) growing in the Samara Region. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhya*. 2021; (5–6):

- 92–97.
8. Gouveia MJ, Brindley PJ, Gärtner F, Costa JMCD, Vale N. Drug Repurposing for Schistosomiasis: Combinations of Drugs or Biomolecules. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018; 11 (1): 15.
 9. Rashmi SP, Yogendra P, Motamarri VNLC, Avijit M, Navneet K, Prabin KT. Discerning the multi-dimensional role of Salicin: bioactive glycoside beyond analgesic: different perspectives. *Current Drug Therapy*. 2024; 19 (7): e221123223716.
 10. V. Devi Rajeswari. Anthelmintic Activity of Plants: A Review. *Research Journal of Phytochemistry*. 2014; 8: 57–63.
 11. Sangkam W, Arunsan P, Pechdee P, Boonsuya A, Thanchonnang C, Chatdumrong W, et al. Anthelmintic activity and pathophysiological effect of anthelmintic drugs against carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Trop Biomed*. 2024; 41 (2): 196–205.
 12. Pershina AG, Saltykova IV, Ivanov VV, Perina EA, Demin AM, Shevelev OB, et al. Hemozoin "knobs" in *Opisthorchis felineus* infected liver. *Parasit Vectors*. 2015; (8): 459.
 13. Wong Y, Pearson MS, Fedorova O, Ivanov V, Khmelevskaya E, Tedla B. Secreted and surface proteome and transcriptome of *Opisthorchis felineus*. *Frontiers in Parasitology*. 2023; (2): 1195457.
 14. Ponomarev D, Lvova M, Mordvinov V, Chidunchi I, Dushkin A, Avgustinovich D. Anti-*Opisthorchis felineus* effects of artemisinin derivatives: An in vitro study. *Acta Trop*. 2024; 254: 107196.
 15. Pakharukova MY, Shilov AG, Pirozhkova DS, Katokhin AV, Mordvinov VA. The first comprehensive study of praziquantel effects in vivo and in vitro on European liver fluke *Opisthorchis felineus* (Trematoda). *Int J Antimicrob Agents*. 2015; 46 (1): 94–100.
 16. Yao HR, Liu J, Plumeri D, Cao YB, He T, Lin L, et al. Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *American journal of translational research*. 2011; 3 (3): 284.
 17. Zhang M, Lai J, Wu Q, Lai J, Su J, Zhu B. Naringenin induces HepG2 cell apoptosis via ROS-mediated JAK-2/STAT-3 signaling pathways. *Molecules*. 2023; 28 (11): 4506.
 18. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008; 3 (7): 1125–13.
 19. Lee SE, Ju EM, Kim JH. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from *Smilax china* root. *Experimental & molecular medicine*. 2001; 33 (4): 263–8.
 20. Pechdee P, Arunsan P, Boonsuya A, Thanchonnang C, Phinsiri S, Rattanapitoot N, et al. Efficacy of *Thunbergia laurifolia* crude extracts against carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. *Tropical Biomedicine*. 2025; 42 (1): 65–75.
 21. Elmahy RA, Radwan NA. In vitro evaluation of the nematicidal efficacy of quercetin on adult *Toxocara canis*. *Acta Parasitol*. 2025; 70 (3): 96.
 22. Ray MS, Mondal C, Saha S, Mandal S, Lyndem LM. Quercetin: An anthelmintic potential against zoonotic tapeworm *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819). *J Helminthol*. 2025; (99): e9.
 23. Brzhozovskiy AG, Semenov SD, Zhrebker AY, Bugrova AE, Yurova MN, Zhernov YV. Hepatoprotective activity of nature-derived polyphenols studied by mass spectrometry based multi-OMICS approach. *Int J Mol Sci*. 2025; 26 (4): 1604.

ЭКСПРЕССИЯ ЭКТОНУКЛЕОТИДАЗ CD39 И CD73 В КРОВИ БОЛЬНЫХ РАЗНЫМИ ФОРМАМИ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АССОЦИИРОВАННОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Г. А. Жулай¹✉, И. В. Курбатова¹, О. П. Дуданова^{1,2}

¹ Институт биологии, Карельский научный центр Российской академии наук, Петрозаводск, Россия

² Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

Экспериментальные исследования показали защитную роль экспрессии эктонуклеотидаз, в частности CD39 и CD73, в ограничении воспаления при патологии печени, но их экспрессия у больных метаболически ассоциированной жировой болезнью печени (МАЖБП) мало изучена. Целью работы было оценить уровни мРНК генов *ENTPD1* и *NT5E*, кодирующих CD39 и CD73 соответственно, у пациентов с разными формами МАЖБП: стеатозом печени (СП) и метаболически ассоциированным стеатогепатитом (МАСГ), а также оценить содержание CD39- и CD73-экспрессирующих клеток при активации иммунных клеток *in vitro*. Обследовали 29 здоровых доноров и 56 пациентов с МАЖБП. Проводили оценку уровня мРНК генов *ENTPD1* и *NT5E*, уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО α), уровня фрагментированного цитокератина-18 и содержания CD39⁺ клеток в крови обследованных людей. Кроме того, оценивали влияние активации иммунных клеток на содержание CD39⁺ и CD73⁺-клеток у пациентов с МАСГ и здоровых доноров *in vitro*. Установлено, что экспрессия гена *ENTPD1* ($p = 0,007$ при сравнении с контролем; $p = 0,010$ — с СП) и содержание CD39⁺-клеток в популяции моноцитов ($p = 0,004$ — с контролем; $p = 0,003$ — с СП) и лимфоцитов ($p = 0,034$ — с контролем) снижены при МАСГ относительно групп контроля и СП. Показано, что активация клеток пациентов с МАСГ увеличивает уровень CD39⁺-лимфоцитов, но не CD14⁺-моноцитов, а CD73⁺-клеток — среди лимфоцитов и CD14⁺-моноцитов. Таким образом, представляется перспективным дальнейшее изучение CD39 и CD73 в механизмах прогрессирования МАЖБП.

Ключевые слова: метаболически ассоциированная жировая болезнь печени, метаболически ассоциированный стеатогепатит, CD39, CD73, CD14⁺-моноциты, CD4⁺ Т-клетки

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-25-00534) на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

Вклад авторов: Г. А. Жулай, И. В. Курбатова — планирование работы, сбор, обработка и анализ материала, статистическая обработка, написание текста; О. П. Дуданова — формирование клинических групп, анализ клинических данных, редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Министерства здравоохранения Республики Карелия и Петрозаводского государственного университета (протокол № 48 от 10 марта 2023 г.). От участников исследования получено добровольное информированное согласие и согласие на обработку данных.

✉ **Для корреспонденции:** Галина Анатольевна Жулай
ул. Пушкинская, д. 11, г. Петрозаводск, Республика Карелия, Россия; zhgali-111@yandex.ru

Статья получена: 11.11.2025 **Статья принята к печати:** 12.12.2025 **Опубликована онлайн:** 21.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.079

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/>).

BLOOD EXPRESSION OF CD39 AND CD73 ECTONUCLEOTIDASES IN PATIENTS WITH VARIOUS FORMS OF METABOLIC-ASSOCIATED FATTY LIVER DISEASE

Zhulai GA¹✉, Kurbatova IV¹, Dudanova OP^{1,2}

¹ Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia

² Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

Experimental studies have demonstrated the protective role of ectonucleotidases — particularly CD39 and CD73 — in limiting inflammation connected to a liver pathology. However, their expression in metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) has not been thoroughly investigated. This study aimed to evaluate the mRNA levels of the *ENTPD1* and *NT5E* genes, which encode CD39 and CD73, respectively, in patients with different forms of MAFLD (liver steatosis (LS) and metabolic-associated steatohepatitis (MASH)), and to assess the expression of CD39- and CD73-positive cells following immune cell activation *in vitro*. The sample included 29 healthy donors and 56 MAFLD patients. We measured the mRNA levels of the *ENTPD1* and *NT5E* genes, pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF α), fragmented cytokeratin-18, and the blood content of CD39⁺ cells. Another parameter measured *in vitro* was the effect of immune cell activation on the proportion of CD39⁺ and CD73⁺ cells in patients with MASH and healthy donors. The expression of the *ENTPD1* gene ($p = 0.007$ vs. control group; $p = 0.010$ vs. LS group) and the proportion of CD39⁺ cells among monocytes ($p = 0.004$ vs. control group; $p = 0.003$ vs. LS group) and lymphocytes ($p = 0.034$ vs. control group) were lower in the MASH group compared with both the control and LS groups. Activation of cells from MASH patients increased the proportion of CD39⁺ lymphocytes, but not that of CD14⁺ monocytes. It also increased the proportion of CD73⁺ cells among both lymphocytes and CD14⁺ monocytes. Thus, further investigation into the roles of CD39 and CD73 in the context of MAFLD progression represents a promising avenue for future research.

Keywords: metabolic-associated fatty liver disease, metabolic-associated steatohepatitis, CD39, CD73, CD14⁺ monocytes, CD4⁺ T cells

Funding: the work was supported by grant No. 25-25-00534 of the Russian Science Foundation and used equipment of the Collective Use Centre of Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences.

Author contribution: Zhulai GA, Kurbatova IV — study planning, collection, processing and analysis of material, statistical processing, article authoring; Dudanova OP — formation of clinical groups, analysis of clinical data, article editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Ministry of Health of the Republic of Karelia and Petrozavodsk State University (Minutes No. 48 of March 10, 2023). All participants signed the voluntary informed consent form and the consent form for personal data processing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Galina A. Zhulai
Pushkinskaya, 11, Petrozavodsk, Russia; zhgali-111@yandex.ru

Received: 11.11.2025 **Accepted:** 12.12.2025 **Published online:** 21.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.079

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/>).

Метаболически ассоциированная жировая болезнь печени (МАЗБП) — хроническое неинфекционное, медленно прогрессирующее мультифакториальное заболевание, чрезвычайно распространенное в мире и в России в частности. По последним данным, распространенность МАЗБП в России и в мире составляет 29–35% среди взрослого населения [1, 2].

Согласно современным представлениям, сложный патогенез МАЗБП включает в себя формирование инсулинорезистентности, нарушение аутофагии, липотоксичность, воспаление, дисбаланс цитокинов и адипокинов, активацию иннантного иммунитета и микробиоты, воздействие экологических и генетических факторов [3, 4]. По стадиям выделяют ряд клинико-морфологических форм МАЗБП: стеатоз, метаболически ассоциированный стеатогепатит (МАСГ) (с фиброзом или без) и цирроз печени (ЦП) [3]. Стеатоз печени (СП) характеризуется доброкачественным клиническим течением, тогда как МАСГ отличается прогрессирующим течением с возможным развитием ЦП и гепатоцеллюлярной карциномы. Ранний МАСГ длительное время протекает бессимптомно, однако его многолетнее течение, несмотря на минимальные отклонения в рутинных лабораторных показателях состояния печени, приводит к развитию целого ряда коморбидных патологий (сахарный диабет 2-го типа, гипертоническая болезнь, хроническая болезнь почек и др.), которые ухудшают как трудовой прогноз пациентов, так и прогноз для жизни. Наряду с этим, механизмы прогрессирования МАЗБП остаются мало изученными [4]. Среди ключевых проблем современной гастроэнтерологии — проблема поиска альтернатив биопсии печени для дифференциации МАСГ от СП [5].

Известно, что при МАЗБП имеет место тесная взаимосвязь процессов воспаления, апоптоза и фиброза, и важную роль в интеграции этих процессов играют иммунные клетки и цитокины [6–8]. Многие авторы убедительно продемонстрировали взаимосвязь фрагментированного цитокератина-18 (ФЦК-18) с лабораторными и гистологическими признаками воспаления при МАСГ [9, 10].

Одним из перспективных направлений в ограничении воспаления в настоящее время является исследование баланса АТФ–аденозин. Внеклеточный АТФ высвобождается из клетки при некрозе, апоптозе или гипоксии, направляет фагоциты в места воспаления, приводит к активации инфламмосомы с последующим высвобождением провоспалительных цитокинов. Внеклеточный аденозин затем действует как ограничитель воспаления и тканевого повреждения, оказывая противовоспалительное действие [11]. Ключевыми ферментами в образовании внеклеточного аденозина являются эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1 (ENTPD1, или CD39), которая расщепляет АТФ и АДФ до АМФ, и экто-5'-нуклеотидаза (NT5E, или CD73), которая из АМФ образует аденозин.

Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что CD39 и CD73 играют важную роль в заболеваниях печени [12–14]. Показано, что делеция CD39 в экспериментальных моделях является причиной инсулинорезистентности и обострения воспаления в печени [15]. Кроме того, показана роль дефицита CD39 в повреждении желчных протоков и фиброзе посредством привлечения цитотоксических Т-клеток [16]. Недостаток аденозинового рецептора A2A, как в макрофагах, так и в гепатоцитах сопровождался усилением тяжести МАЗБП, вероятно, за счет усиления воспаления и липогенеза [17]. Дефосфорилируя АТФ до аденозина, эктонуклеотидазы CD39 и CD73 играют

защитную роль, предотвращая местное и системное воспаление. Значение этого механизма при МАЗБП не исследовано. Целью работы было оценить уровни мРНК генов *ENTPD1* и *NT5E*, кодирующих CD39 и CD73 соответственно, у больных разными формами МАЗБП (СП, МАСГ), а также оценить содержание CD39- и CD73-экспрессирующих клеток при активации иммунных клеток *in vitro*.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 56 больных МАЗБП: 31 человек с простым стеатозом печени (группа СП) и 25 человек с МАСГ умеренной и высокой активности (группа МАСГ). Контрольную группу составили 29 здоровых человек.

Критерии включения в контрольную группу: нормальный ИМТ, нормальные функциональные печеночные тесты, нормальная структура печени при сонографии и нормальная жесткость печени.

Критерии исключения из контрольной группы: наличие кардиометаболических факторов риска, установленный диагноз НАЖБП, прием лекарственных препаратов.

Критерии исключения, общие для изучаемых групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, беременность и лактация, курение, употребление алкоголя.

Критерии включения пациентов в исследование: установленный диагноз НАЖБП (СП или МАСГ), наличие хотя бы одного кардиометаболического фактора риска.

Критерии исключения пациентов НАЖБП из исследования: вирусный генез поражения печени на основании отсутствия серологических маркеров HBV-, HCV-инфекции; аутоиммунный генез — на основании отсутствия аутоантител к структурам гепатоцитов; алкогольный генез — на основании анамнестических, клинических данных, данных шкал CAGE, AUDIT; лекарственный генез — на основании анамнестических данных; сахарный диабет 1-го и 2-го типов; цирроз печени; гепатотропная или иная терапия, проводимая на момент забора материала для исследования.

Здоровые доноры и пациенты МАЗБП были обследованы врачами терапевтического отделения ЧУЗ КБ «РЖД-медицина» (г. Петрозаводск). Диагноз МАЗБП с определением формы (СП, МАСГ) устанавливали на основании традиционных клинических, лабораторных, инструментальных и гистологических данных, согласно клиническим рекомендациям [3]. Все пациенты имели признаки метаболического синдрома. У всех пациентов имелся хотя бы один кардиометаболический фактор риска, чаще всего — дислипидемия (у 64% СП и 93% МАСГ) и висцеральное ожирение — у всех 100% пациентов (ИМТ (индекс массы тела) > 25 кг/м²). Пациентам выполняли ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости на аппарате Vivid Pro-7 (General Electric, США), которое выявляло усиление эхогенности ткани печени, превышающее эхогенность правой почки. Оценивали жесткость печени при эластометрии методом сдвиговой волны ARFI на аппарате Mindray DC-80 (Mindray, Китай). Ни у кого из пациентов не было признаков портальной гипертензии — отсутствовал асцит, при эзофагогастроскопии не выявлялись варикозные вены пищевода и кардиального отдела желудка. Больным выполняли слепую чрескожную биопсию печени с оценкой гистологической активности и фиброза по методу Brunt et al. [18], на основании которой верифицировали форму

МАЖБП: стеатоз ($\geq 5\%$ гепатоцитов) без воспаления и баллонной дистрофии гепатоцитов или стеатогепатит с наличием активного повреждения в форме гепатоцеллюлярной баллонной дегенерации и дольковой воспаления (в основном лимфоцитарного с некоторым количеством нейтрофилов), в дополнение к различной степени стеатоза. По результатам гистологического исследования, у всех пациентов фиброз не превышал стадию F2.

В качестве материала для исследования использовали образцы венозной крови, собранной из локтевой вены натошак в пробирки с антикоагулянтом К2ЭДТА. Клинико-лабораторная оценка печеночных функциональных проб, выделение лейкоцитов периферической крови (ЛПК) и плазмы, а также анализ содержания клеток, экспрессирующих CD39, выполняли в течение часа после забора крови. Плазму крови, тотальную РНК, выделенную из ЛПК, и полученные осаждением на градиенте плотности фиколла ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$; Биолот) мононуклеарные клетки (МНК) помещали в биобанк на хранение (не более 3 месяцев) при температуре -80°C . Взятие материала у пациентов проводили в период госпитализации до назначения терапии, за 2–3 дня до биопсии печени и эластомерии.

Оценку печеночных функциональных проб: уровня аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), общего билирубина, щелочной фосфатазы (ЩФ), глюкозы, общего холестерина (ОХС), ЛПВП, триглицеридов, С-реактивного белка (СРБ) — проведена на анализаторе Random Access F-15 (BioSystems, Испания) с использованием реактивов фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Уровень ЛПНП рассчитывали по формуле Фридвальда. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) определяли методом Вестергрена.

Методом ИФА в плазме крови определяли концентрацию тканевого полипептид-специфического антигена (показателя апоптоза гепатоцитов ФЛЦК-18), фактора некроза опухоли альфа (ФНО α) и интерлейкина-6 (ИЛ-6) на планшетном мультимодальном ридере SuPerMax 3100 (Flash Spectrum, Китай). Использовали тест-системы «TPS ELISA» (Biotech, Швеция), «Human TNF α Platinum ELISA» (eBioscience, Австрия), «Интерлейкин-6 – ИФА – Бест» («Вектор-Бест», Россия).

Тотальную РНК из ЛПК выделяли с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия). Относительный уровень транскриптов генов *ENTPD1* и *NT5E* в ЛПК оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени на приборе Light Cycler (Roche, Германия) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). Праймеры для амплификации гена *ENTPD1* — прямой 5'-AGCAGCTGAAATATGCTGGC-3', обратный 5'-GAGACAGTATCTGCCGAAGTCC-3'; для гена *NT5E* — прямой 5'-ATTGCAAAGTGGTTCAAAGTCA-3', обратный 5'-ACACTTGGCCAGTAAAATAGGG-3'. В качестве референсного использовали ген *18S rRNA* праймеры к которому — прямой 5'-AGAAACGGCTACCACATCCA-3', обратный 5'-CACCAGACTTGCCCTCCA-3'. Условия проведения ПЦР были следующие: денатурация кДНК 5 мин 95°C ; 40 циклов: денатурация при 95°C 30 с, отжиг при температуре 64°C 30 с, элонгация при 72°C 30 с. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов. Повторность при ПЦР-анализе — трехкратная. Относительный уровень транскриптов оценивали по Livak and Schmittgen [19].

Оценку относительного содержания клеток исследуемых популяций проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Образцы крови или клеточную суспензию окрашивали FITC-, PE-, PerCP-,

PE-Cy7-мечеными моноклональными антителами против CD39, CD4, CD25, CD161 и CD14 антигенов, а также соответствующими изотипическими контролями (Sony Biotechnology, США и eBioscience, США). Эритроциты были лизированы реагентом FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США). Для определения CD39- и CD73-экспрессирующих клеток был использован контроль FMO (fluorochrome minus one). Абсолютное количество клеток определяли исходя из данных клинического анализа крови.

Для оценки влияния активации на содержание CD39 $^+$ - и CD73 $^+$ -клеток выделенные МНК больных МАСГ ($n = 6$) и здоровых доноров ($n = 6$) высаживали в 48-луночные планшеты ($3\text{--}5 \times 10^5$ клеток на лунку) в среде RPMI-1640 (Servicebio), дополненной 10% термоинактивированной ЭТС, Биолот), L-глутамином (2 мМ), пенициллином (100 ЕД/мл) и стрептомицином (100 мг/мл) (Servicebio) при 37°C в 5% CO_2 в течение 24 ч. Клетки активировали классическими стимуляторами: для лимфоцитов использовали ФГА в конечной концентрации 10 мкг/мл (Биолот), для моноцитов — ЛПС (Пирогенал, МЕДГАМАЛ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи) в концентрации 1 мкг/мл.

Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism v.8. (GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, США). Данные на графиках представлены в виде $\text{Me} (Q_1\text{--}Q_3)$. Значения $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые. В связи с несоответствием распределений показателей в группах нормальному (согласно критерию *W* Шапиро–Уилка), использовали непараметрические критерии для анализа. При сравнении изучаемых показателей в группах использовали критерий *H* Краскела–Уоллиса с последующим парным сравнением групп с помощью критерия *U* Манна–Уитни. Парное сравнение связанных показателей выполнили с использованием Т-критерия Уилкоксона. Взаимосвязь показателей оценивали с помощью расчета рангового коэффициента корреляции Спирмена (*r*). Для оценки силы связи между двумя величинами использовали шкалу Чеддока.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-лабораторная характеристика пациентов СП, МАСГ и здоровых людей представлена в табл. 1. У пациентов МАСГ по сравнению с СП повышен уровень активности аминотрансфераз в крови, клинических маркеров воспаления (СРБ, СОЭ), ЛПНП, а также концентрация ФЛЦК-18 (табл. 1, 2). Уровень основных провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-6) в плазме крови пациентов МАЖБП выше, чем у здоровых людей, при этом нет различий между формами заболевания (табл. 2).

Проведен сравнительный анализ уровней мРНК гена *ENTPD1*, кодирующего эктонуклеотидазу CD39, и гена *NT5E*, кодирующего фермент CD73, в ЛПК пациентов МАЖБП и здоровых доноров. По результатам дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса, группы исследования статистически значимо различаются по уровню мРНК гена *ENTPD1* ($N = 8,830$, $p = 0,012$), но не по уровню мРНК гена *NT5E* ($N = 0,618$, $p = 0,734$) (рис. 1). Показано, что уровень экспрессии гена *ENTPD1* у пациентов МАСГ ниже, чем у здоровых людей и пациентов с СП. При этом при СП уровень мРНК гена *ENTPD1* не отличается от контроля (рис. 1А).

Поскольку достоверные различия между группами исследования выявлены в отношении экспрессии гена *ENTPD1*, далее мы провели корреляционный анализ уровня мРНК гена *ENTPD1* у пациентов с МАЖБП и здоровых

Таблица 1. Клиническая и лабораторная характеристика групп исследования

Показатель	Контроль (n = 29)	СП (n = 31)	МАСГ (n = 25)
Возраст, годы	43,72 ± 1,12 (44,81)	48,43 ± 1,63 (48,10)	46,29 ± 2,27 (47,50)
Мужчины/женщины (n)	14/15	15/16	12/13
АлАТ, Ед./л	16,04 ± 1,25 (14,76)	23,16 ± 1,74 (21,90)	116,80 ± 27,67 (84,85)**
АсАТ, Ед./л	20,60 ± 0,86 (20,35)	23,92 ± 0,90 (23,90)	75,01 ± 8,48 (65,95)**
Билирубин общий, мкмоль/л	15,14 ± 2,20 (12,20)	15,40 ± 1,38 (13,30)	16,85 ± 2,23 (15,92)*
ЩФ, Ед./л	96,37 ± 11,12 (83,20)	141,24 ± 16,17 (143,21)*	173,21 ± 16,54 (165,43)*
СРБ, мг/л	1,06 ± 0,17 (0,95)	1,18 ± 0,40 (1,25)	4,87 ± 0,11 (4,87)**
СОЭ, мм/ч	8,65 ± 1,94 (6,00)	10,87 ± 2,06 (7,00)	17,38 ± 4,77 (12,00)**
Глюкоза, ммоль/л	5,12 ± 0,07 (5,02)	5,20 ± 0,10 (5,20)	5,31 ± 0,11 (5,28)
ОХС, ммоль/л	5,04 ± 0,16 (4,96)	5,09 ± 0,19 (5,03)	5,56 ± 0,22 (5,60)*
ЛПВП, ммоль/л	1,40 ± 0,06 (1,30)	1,36 ± 0,13 (1,11)	1,22 ± 0,12 (1,03)
ЛПНП, ммоль/л	3,01 ± 0,18 (2,56)	2,74 ± 0,15 (2,68)	3,81 ± 0,24 (3,80)**
Триглицериды, ммоль/л	1,22 ± 0,12 (1,09)	1,81 ± 0,19 (1,55)	1,91 ± 0,14 (1,94)*
ИМТ, кг/м ²	23,88 ± 1,10 (23,77)	33,81 ± 0,78 (33,10)*	34,40 ± 1,13 (34,25)*
Лимфоциты, %	33,33 ± 0,99 (33,00)	31,36 ± 1,34 (31,00)	32,09 ± 1,1 (31,07)
Лимфоциты, ×10 ⁹ /л	2,11 ± 0,10 (2,23)	2,09 ± 0,12 (1,92)	1,91 ± 2,17 (0,14)
Моноциты, %	7,06 ± 0,35 (6,80)	7,63 ± 0,44 (7,35)	7,68 ± 0,46 (7,55)
Моноциты, ×10 ⁹ /л	0,44 ± 0,03 (0,41)	0,51 ± 0,03 (0,46)	0,50 ± 0,01 (0,45)

Примечание: данные представлены как $M \pm m$, в скобках — медиана; * — достоверное отличие от группы контроля, # — достоверное отличие от группы СП (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

доноров с комплексом биохимических показателей крови (помимо рутинных клинических показателей, с концентрацией ФЦК-18 и провоспалительных цитокинов, ФНО α и ИЛ-6 (табл. 1 и 2)). Установлена умеренная положительная взаимосвязь относительного уровня мРНК гена *ENTPD1* с уровнем ЛПНП в крови пациентов СП ($r = 0,379$, $p = 0,039$).

Обследованные нами группы МАЖБП не отличались по содержанию лимфоцитов и моноцитов в крови от контроля (табл. 1). Однако в связи с полученными данными (рис. 1) следующей задачей было оценить содержание эктонуклеотидазы CD39 на ЛПК при МАЖБП. Известно, что CD39 содержится на поверхности многих иммунных клеток [20]. В работе анализировали частоту встречаемости CD39⁺-клеток для гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов. Среди лимфоцитов исследовали количество CD39⁺-клеток в целом в популяции CD4⁺-Т-хелперов и на их отдельных субпопуляциях — иммуносупрессорных Трег-клетках (CD4⁺CD25^{hi}) и провоспалительных Th17 (CD4⁺CD161⁺). Данные представлены в табл. 3 и на рис. 2.

Показано, что в группе МАСГ достоверно снижено относительное содержание CD39⁺-моноцитов по сравнению с контролем и с группой СП (табл. 3, рис. 2). Гранулоциты, как у больных, так и у здоровых доноров, практически все были CD39-положительными (табл. 3). У больных МАСГ также наблюдали пониженное относительное и абсолютное содержание CD39⁺-лимфоцитов по сравнению с контролем

(табл. 3). Отмечено, что содержание CD39⁺ Трег-клеток было выше в группе МАСГ по сравнению со здоровыми донорами (рис. 2). Примечательно, что количество самих Трег-клеток у больных СП ($p = 0,007$) и МАСГ ($p = 0,013$) было ниже, чем в контроле.

Чтобы выяснить, связана ли экспрессия эктонуклеотидазы CD39 и CD73 на моноцитах и лимфоцитах у больных МАСГ с активацией, клетки больных МАСГ и здоровых доноров (контроль) были стимулированы и проанализированы через 24 ч на проточном цитометре. Определяли содержание CD39- и CD73-положительных клеток в гейтах лимфоцитов, CD4⁺ Т-клеток и CD14⁺-моноцитах. Кроме того, определяли медиану интенсивности флуоресценции (MFI) для CD39 и CD73, которая отражает плотность экспрессии антигенов на клетках. Результаты представлены на рис. 3.

Известно, что в норме при активации лимфоцитов, в особенности Т-клеток, ферментативная активность CD39 и количество CD39⁺-клеток увеличивается [21]. В работе мы наблюдали повышение числа CD39⁺-клеток в культуре лимфоцитов, в частности среди CD4⁺-Т-клеток, с добавлением митогена в контроле и при МАСГ (рис. 3А). Изменения в CD39 MFI были отмечены только в гейте лимфоцитов, как в контроле, так и при МАСГ (рис. 3В). Отмечено, что на содержание CD14⁺CD39⁺-моноцитов присутствие ЛПС не оказывало влияния (рис. 3А).

При анализе числа CD73⁺-клеток при активации МНК пациентов с МАСГ и здоровых доноров (рис. 3Б) выявлены

Таблица 2. Содержание цитокинов и уровень ФЦК-18 в плазме крови пациентов МАЖБП и у здоровых доноров

Показатель	Контроль (n = 29)	СП (n = 31)	МАСГ (n = 25)
ФЦК-18, Ед/л	80,36 ± 10,06 (83,80)	130,60 ± 13,83 (129,00)*	423,90 ± 84,60 (269,70)**
ФНО α , пг/мл	4,01 ± 0,35 (3,58)	5,86 ± 0,33 (5,89)*	6,50 ± 0,35 (6,67)*
ИЛ-6, пг/мл	1,79 ± 0,18 (1,75)	5,31 ± 0,88 (4,25)*	6,89 ± 1,28 (6,71)*

Примечание: данные представлены как $M \pm m$, в скобках — медиана; * — достоверное отличие от группы контроля, # — достоверное отличие от группы СП (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони).

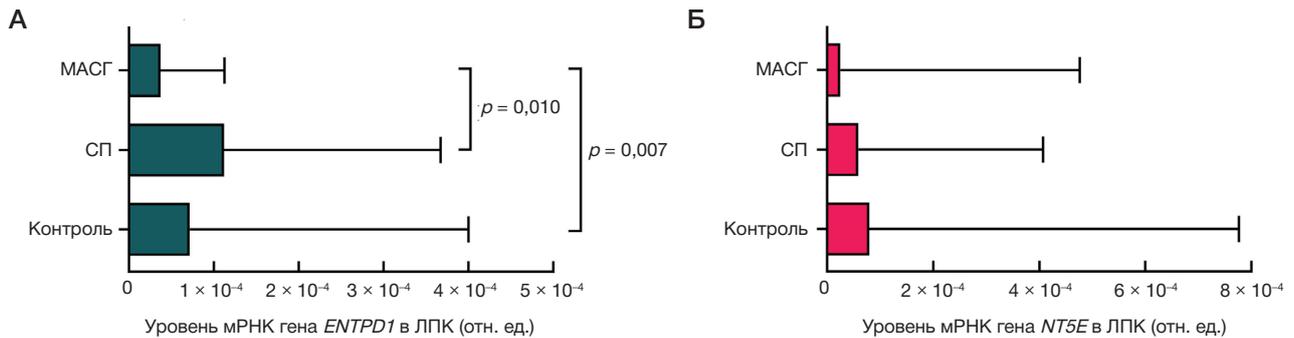


Рис. 1. Уровень мРНК гена *ENTPD1* (А) и гена *NT5E* (Б) в ЛПК больных МАЖБП и здоровых доноров. Представлены *Me* и межквартильный размах. Достоверные различия по *U*-критерию Манна-Уитни с поправкой Бонферрони

достоверные различия в содержании CD73⁺-клеток при активации лимфоцитов и CD14⁺-моноцитов пациентов с МАСГ: после добавления стимулятора количество несущих на своей поверхности CD73-клеток увеличилось (рис. 3Б), в отличие от здоровых доноров, у которых достоверные изменения в числе CD73⁺-клеток были отмечены только для CD4⁺-Т-клеток. Повышение CD73 MFI наблюдали после активации в гейте лимфоцитов (рис. 3Г) у здоровых и у пациентов с МАСГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе прогрессирования печеночно-клеточной недостаточности при МАЖБП лежат иммуновоспалительные процессы, важнейшая роль в реализации которых принадлежит лейкоцитам [6, 8]. Известно, что в периферической крови эктонуклеотидазы CD39 и CD73 содержатся на поверхности разных иммунных клеток. Кроме того, экспрессия фермента может быть индуцирована воздействием окислительного стресса и гипоксии, а также провоспалительными цитокинами [22]. Уровень эктонуклеотидаз, определенный в основном посредством экспериментальных моделей, описан при некоторых острых и хронических патологиях печени [22]. Однако экспрессия CD39 и CD73 в крови больных МАЖБП и на отдельных популяциях иммунных клеток не была исследована. В связи с этим, нами проведена сравнительная оценка экспрессии эктонуклеотидаз на уровне мРНК и на поверхности ЛПК пациентов с разными формами МАЖБП (СП, МАСГ).

Показано, что на стадии простого СП уровень мРНК гена *ENTPD1* и содержание данного фермента на поверхности ЛПК находятся на уровне контроля. При МАСГ экспрессия CD39, как на уровне мРНК в ЛПК, так и на уровне белка на поверхности моноцитов, достоверно ниже, чем при СП и контроле (рис. 1, рис. 2, табл. 3). Кроме

того, в работе установлено, что изменение числа CD39⁺-клеток происходит среди моноцитов, а также Трег-клеток пациентов с МАСГ. Отмечено, что число CD39⁺-клеток среди Трег-клеток пациентов с МАСГ было выше, чем в контроле, однако содержание самих Трег-клеток у этих пациентов было снижено. Вероятно, усиление экспрессии CD39 на поверхности этих клеток связано с компенсацией их низкого количества, поскольку генерация внеклеточного аденозина, посредством продукции CD39, является одним из основных механизмов Трег-ассоциированной иммуносупрессии [20]. И их количества в крови больных МАСГ недостаточно, чтобы повлиять на функционирование провоспалительных клеток.

Кроме того, в работе показано, что уровень CD14⁺CD39⁺-моноцитов у пациентов с МАСГ не восстанавливается до уровня CD14⁺CD39⁺-моноцитов здоровых доноров при активации клеток *in vitro* (рис. 3). В литературе отмечается, что низкая экспрессия CD39 на моноцитах может иметь неблагоприятное значение. Так, пониженное содержание CD39⁺-моноцитов описывается как потенциальный диагностический биомаркер и предиктор неблагоприятного прогноза у пациентов с сепсисом [23].

Снижение экспрессии CD39 при МАСГ может приводить к снижению внеклеточной деградации АТФ и АДФ и, как следствие, к снижению уровня противовоспалительного аденозина, что может способствовать прогрессированию воспаления и инсулинорезистентности. Это предположение подтверждается данными о патологическом влиянии дефицита *ENTPD1*/CD39 на данные процессы при повреждении печени [15, 16].

При изучении активности CD39 в тромбоцитах пациентов с гиперхолестеринемией [21] было показано, что гиперхолестеринемия (в том числе повышение уровня ЛПНП) связана с усилением воспалительной реакции, окислительного стресса и гидролиза АТФ и АДФ. Увеличение активности CD39 авторы объяснили компенсаторным

Таблица 3. Относительное и абсолютное содержание CD39-экспрессирующих клеток в популяциях клеток крови больных МАЖБП и здоровых доноров

	Контроль	СП	МАСГ
Лимфоциты CD39 ⁺ -клетки, % CD39 ⁺ -клетки, ×10 ⁹ /л	12,40 (11,05–14,78) 0,33 (0,26–0,42)	11,25 (9,84–12,59) 0,24 (0,18–0,30)	10,65 (9,85–12,10)* 0,20 (0,19–0,30)*
Моноциты CD39 ⁺ -клетки, % CD39 ⁺ -клетки, ×10 ⁹ /л	80,17 (70,98–88,41) 0,37 (0,31–0,49)	76,95 (68,88–81,54) 0,35 (0,28–0,40)	61,46 (53,64–71,94)*# 0,33 (0,24–0,41)
Гранулоциты CD39 ⁺ -клетки, %	94,65 (90,68–97,14)	95,65 (92,49–97,90)	94,65 (90,68–94,65)

Примечание: данные представлены в виде *Me* (Q₁–Q₃). * — достоверное отличие от группы контроля, # — достоверное отличие от группы СП (*U*-критерий Манна-Уитни). Выделение популяций клеток на основе прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния.

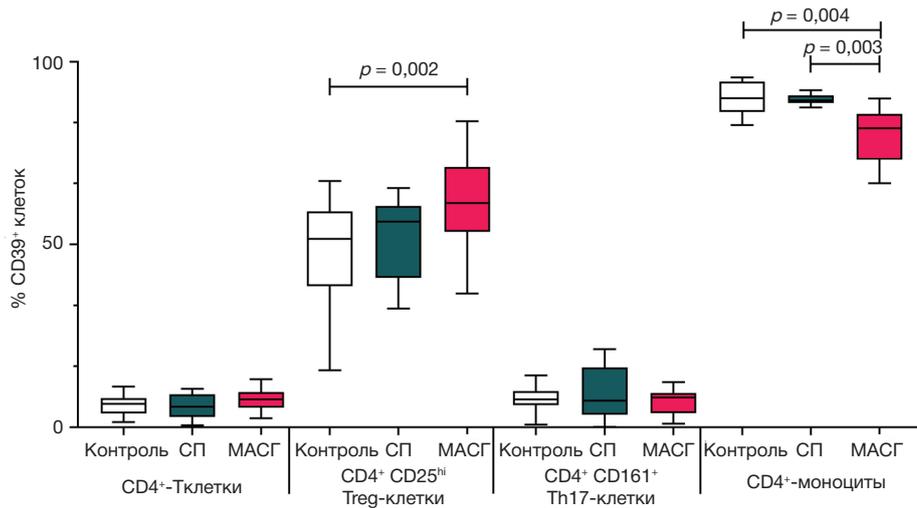


Рис. 2. Относительное содержание CD39-экспрессирующих клеток в популяциях клеток крови больных МАЖБП и здоровых доноров. Представлены Me, межквартильный размах, минимальное и максимальное значения

ответом на воспалительное и прооксидантное состояние, связанное с гиперхолестеринемией [24]. Интересно, что на ранней стадии МАЖБП — СП в условиях накопления липидов гепатоцитами и низкого уровня субклинического воспаления нами не зарегистрировано снижение экспрессии CD39 в периферической крови по сравнению с контролем, при этом установлена умеренная положительная корреляция

уровня мРНК гена *ENTPD1* с уровнем ЛПНП. Ранее были получены доказательства связи холестерина обмена и активности CD39. *In vitro* было показано, что снижение уровня холестерина в мембране клеток приводит к ингибированию ферментативной и антиагрегантной активности CD39, а обработка мембран холестерином полностью восстанавливает функцию фермента [25].

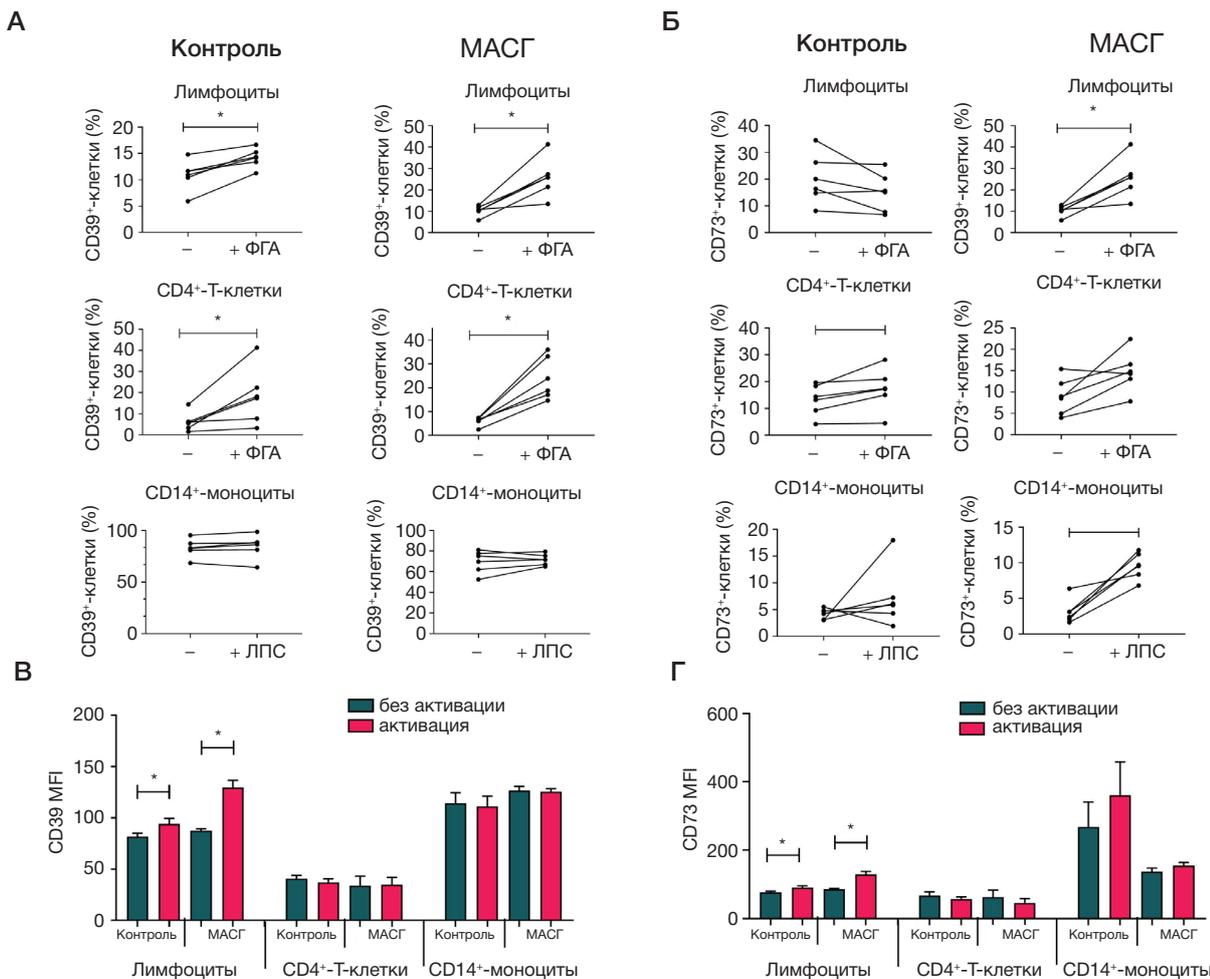


Рис. 3. Изменение содержания клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазы CD39 и CD73, после активации у здоровых доноров ($n = 6$) и больных MASG ($n = 6$). **А.** Содержание CD39⁺-клеток, % от исследуемой популяции. **Б.** Содержание CD73⁺-клеток, % от исследуемой популяции. **В.** MFI (средняя интенсивность флуоресценции) CD39 на клетках с активацией и без. **Г.** MFI CD73 на клетках с активацией и без. Данные представлены как $M \pm SE$, * — достоверные отличия от неактивированных клеток (Т-критерий Уилкоксона)

Однако, в отличие от пациентов с СП, у пациентов с МАСГ при выраженном воспалении и изменениях липидного статуса корреляция уровня мРНК гена *ENTPD1* с концентрацией липидов крови не обнаружена, но выявлено снижение экспрессии CD39 в периферической крови относительно контроля и СП. Вероятно, при МАСГ-прогрессирующее воспаление приводит к нарушению компенсаторных механизмов, поддерживающих дефосфорилирование АТФ до аденозина при повреждении печени. Изменения в экспрессии эктонуклеотидазы CD39 могут быть обнаружены и для других популяций иммунных клеток, так в данной работе не рассматривались В-клетки, которые преимущественно экспрессируют CD39 среди лимфоцитов, а также NK-клетки и CD8⁺-Т-клетки.

Выводы

Таким образом, у пациентов с МАСГ показатели воспаления (СОЭ, СРБ, уровень IL-6 и ФНОα) выше по сравнению со здоровыми донорами. Наряду с этим в работе показано, что при МАСГ экспрессия эктонуклеотидазы CD39 снижена как на уровне мРНК в ЛПК, так и на уровне фермента на поверхности моноцитов и лимфоцитов. Недостаток фермента на поверхности иммунных клеток может приводить к накоплению внеклеточного АТФ и поддерживать тем самым процесс воспаления. В связи с полученными данными представляется перспективным дальнейшее изучение эктонуклеотидазы CD39 в качестве диагностического и прогностического маркера при МАЖБП.

Литература

1. Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, Van Dongen C, Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*. 2023; 77 (4): 1335–47. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000004.
2. Маев И. В., Андреев Д. Н., Кучерявый Ю. А. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени в России: мета-анализ. *Consilium Medicum*. 2023; 25 (5): 313–9. DOI: 10.26442/20751753.2023.5.202155.
3. Ивашкин В. Т., Драпкина О. М., Маевская М. В., Райхельсон К. Л., Оковитый С. В., Жаркова М. С. и др. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российского общества профилактики неинфекционных заболеваний, Российской ассоциации эндокринологов, Российского научного медицинского общества терапевтов, Национального общества профилактической кардиологии, Российской ассоциации геронтологов и гериатров по неалкогольной жировой болезни печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2025; 35 (1): 94–152. DOI: 10.22416/1382-4376-2025-35-1-94-152.
4. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell*. 2021; 184 (10): 2537–64. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.015.
5. Di Mauro S, Scamporrino A, Filippello A, Di Pino A, Scicali R, Malaguarnera R, et al. Clinical and molecular biomarkers for diagnosis and staging of NAFLD. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (21): 11905. DOI: 10.3390/ijms222111905.
6. Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, Kubes P, Heikenwälder M, Tacke F. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease — novel insights into cellular communication circuits. *J Hepatol*. 2022; 77 (4): 1136–60. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.06.012.
7. Kurbatova IV, Topchieva LV, Dudanova OP, Shipovskaya AA. The role of the soluble interleukin-6 receptor in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Bull Exp Biol Med*. 2023; 174 (5): 628–33. DOI: 10.1007/s10517-023-05759-5.
8. Topchieva LV, Kurbatova IV, Dudanova OP, Vasileva AV, Zhulai GA. Immune cell balance as potential biomarker of progressing non-alcoholic fatty liver disease. *Genes & Cells*. 2024; 19 (1): 105–25. DOI: 10.17816/gc610252.
9. Shipovskaya AA, Dudanova OP, Kurbatova IV. Inflammatory cytokines, soluble interleukin-6 receptors, and fragmented cytokeratin-18 as indicators of non-alcoholic steatohepatitis. *Ter Arkh*. 2025; 97 (2): 115–20. DOI: 10.26442/00403660.2025.02.203123.
10. Eguchi A, Iwasa M, Yamada M, Tamai Y, Shigefuku R, Hasegawa H, et al. A new detection system for serum fragmented cytokeratin 18 as biomarker reflecting histological activities of human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2022; 6 (8): 1987–99. DOI: 10.1002/hep4.1971.
11. Pasquini S, Contri C, Borea PA, Vincenzi F, Varani K. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 7685. DOI: 10.3390/ijms22147685.
12. Jain S, Jacobson KA. Purinergic signaling in liver pathophysiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 718429. DOI: 10.3389/fendo.2021.718429.
13. Snider NT, Griggs NW, Singla A, Moons DS, Weerasinghe SV, Lok AS, et al. CD73 (ecto-5'-nucleotidase) hepatocyte levels differ across mouse strains and contribute to mallory-denk body formation. *Hepatology*. 2013; 58 (5): 1790–800. DOI: 10.1002/hep.26525.
14. Wang S, Gao S, Zhou D, Qian X, Luan J, Lv X. The role of the CD39-CD73-adenosine pathway in liver disease. *J Cell Physiol*. 2021; 236 (2): 851–62. DOI: 10.1002/jcp.29932.
15. Sun X, Imai M, Nowak-Machen M, Guckelberger O, Enjoji K, Wu Y, et al. Liver damage and systemic inflammatory responses are exacerbated by the genetic deletion of CD39 in total hepatic ischemia. *Purinergic Signal*. 2011; 7 (4): 427–34. DOI: 10.1007/s11302-011-9239-6.
16. Peng ZW, Rothweiler S, Wei G, Ikenaga N, Liu SB, Sverdlow DY, et al. The ectonucleotidase ENTPD1/CD39 limits biliary injury and fibrosis in mouse models of sclerosing cholangitis. *Hepatol Commun*. 2017; 1 (9): 957–72. DOI: 10.1002/hep4.1084.
17. Cai Y, Li H, Liu M, Qian X, Luan J, Lv X. Disruption of adenosine 2A receptor exacerbates NAFLD through increasing inflammatory responses and SREBP1c activity. *Hepatology*. 2018; 68 (1): 48–61. DOI: 10.1002/jcp.29932.
18. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94 (9): 2467–74. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*. 2001. 25 (4): 402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
20. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (15): 8068. DOI: 10.3390/ijms22158068.
21. Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JH, Kizer JR, Islam N, et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thrombosis research*. 2007; 121 (3): 309–17. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.04.008.
22. Vuerich M, Robson SC, Longhi MS. Ectonucleotidases in intestinal and hepatic inflammation. *Front Immunol*. 2019; 10: 507. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00507.
23. Li H, Ding P, Nan Y, Wu Z, Hua N, Luo L, et al. Low expression of CD39 on monocytes predicts poor survival in sepsis patients. *J intensive care*. 2025; 13: 12. DOI: 10.1186/s40560-025-00784-0.
24. Duarte MM, Loro VL, Rocha JB, Leal DB, Bem AF, Dorneles A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS J*. 2007; 274 (11): 2707–14. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05805.x.
25. Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, Papamarcaki T, Tsolas O, Drab M, et al. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *J Biol Chem*. 2005; 280 (28): 26406–14. DOI: 10.1074/jbc.M41392720014.

References

1. Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, Van Dongen C, Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*. 2023; 77 (4): 1335–47. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000004.
2. Maev IV, Andreev DN, Kucheryavij Yu A. Rasprostranennost' nealkogol'noj zhirovoj bolezni pecheni v Rossii: meta-analiz. *Consilium Medicum*. 2023; 25 (5): 313–9. DOI: 10.26442/20751753.2023.5.202155. Russian.
3. Ivashkin VT, Drapkina OM, Maevskaya MV, Rajhelson KL, Okovityj SV, Zharkova MS, i dr. Klinicheskie rekomendacii Rossijskogo obshchestva po izucheniyu pecheni, Rossijskoj gastroenterologicheskoj asociacii, Rossijskogo obshchestva profilaktiki neinfekcionnyh zabozevanij, Rossijskoj asociacii endokrinologov, Rossijskogo nauchnogo medicinskogo obshchestva terapevtov, Nacional'nogo obshchestva profilakticheskoi kardiologii, Rossijskoj asociacii gerontologov i geriatrov po nealkogol'noj zhirovoj bolezni pecheni. *Rossijskij zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2025; 35 (1): 94–152. DOI: 10.22416/1382-4376-2025-35-1-94-152. Russian.
4. Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell*. 2021; 184 (10): 2537–64. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.015.
5. Di Mauro S, Scamporrino A, Filippello A, Di Pino A, Scicali R, Malaguarnera R, et al. Clinical and molecular biomarkers for diagnosis and staging of NAFLD. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (21): 11905. DOI: 10.3390/ijms222111905.
6. Peiseler M, Schwabe R, Hampe J, Kubes P, Heikenwälder M, Tacke F. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease — novel insights into cellular communication circuits. *J Hepatol*. 2022; 77 (4): 1136–60. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.06.012.
7. Kurbatova IV, Topchieva LV, Dudanova OP, Shipovskaya AA. The role of the soluble interleukin-6 receptor in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *Bull Exp Biol Med*. 2023; 174 (5): 628–33. DOI: 10.1007/s10517-023-05759-5.
8. Topchieva LV, Kurbatova IV, Dudanova OP, Vasileva AV, Zhulai GA. Immune cell balance as potential biomarker of progressing non-alcoholic fatty liver disease. *Genes & Cells*. 2024; 19 (1): 105–25. DOI: 10.17816/gc610252.
9. Shipovskaya AA, Dudanova OP, Kurbatova IV. Inflammatory cytokines, soluble interleukin-6 receptors, and fragmented cytokeratin-18 as indicators of non-alcoholic steatohepatitis. *Ter Arkh*. 2025; 97 (2): 115–20. DOI: 10.26442/00403660.2025.02.203123.
10. Eguchi A, Iwasa M, Yamada M, Tamai Y, Shigefuku R, Hasegawa H, et al. A new detection system for serum fragmented cytokeratin 18 as biomarker reflecting histological activities of human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Commun*. 2022; 6 (8): 1987–99. DOI: 10.1002/hep4.1971.
11. Pasquini S, Contri C, Borea PA, Vincenzi F, Varani K. Adenosine and Inflammation: Here, There and Everywhere. *Int J Mol Sci*. 2021; 22: 7685. DOI: 10.3390/ijms22147685.
12. Jain S, Jacobson KA. Purinergic signaling in liver pathophysiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 718429. DOI: 10.3389/fendo.2021.718429.
13. Snider NT, Griggs NW, Singla A, Moons DS, Weerasinghe SV, Lok AS, et al. CD73 (ecto-5'-nucleotidase) hepatocyte levels differ across mouse strains and contribute to mallory-denk body formation. *Hepatology*. 2013; 58 (5): 1790–800. DOI: 10.1002/hep.26525.
14. Wang S, Gao S, Zhou D, Qian X, Luan J, Lv X. The role of the CD39-CD73-adenosine pathway in liver disease. *J Cell Physiol*. 2021; 236 (2): 851–62. DOI: 10.1002/jcp.29932.
15. Sun X, Imai M, Nowak-Machen M, Guckelberger O, Enyoji K, Wu Y, et al. Liver damage and systemic inflammatory responses are exacerbated by the genetic deletion of CD39 in total hepatic ischemia. *Purinergic Signal*. 2011; 7 (4): 427–34. DOI: 10.1007/s11302-011-9239-6.
16. Peng ZW, Rothweiler S, Wei G, Ikenaga N, Liu SB, Sverdlov DY, et al. The ectonucleotidase ENTPD1/CD39 limits biliary injury and fibrosis in mouse models of sclerosing cholangitis. *Hepatol Commun*. 2017; 1 (9): 957–72. DOI: 10.1002/hep4.1084.
17. Cai Y, Li H, Liu M, Qian X, Luan J, Lv X. Disruption of adenosine 2A receptor exacerbates NAFLD through increasing inflammatory responses and SREBP1c activity. *Hepatology*. 2018; 68 (1): 48–61. DOI: 10.1002/jcp.29932.
18. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol*. 1999; 94 (9): 2467–74. DOI: 10.1111/j.1572-0241.1999.01377.x.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001. 25 (4): 402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
20. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22 (15): 8068. DOI: 10.3390/ijms22158068.
21. Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JH, Kizer JR, Islam N, et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thrombosis research*. 2007; 121 (3): 309–17. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.04.008.
22. Vuerich M, Robson SC, Longhi MS. Ectonucleotidases in intestinal and hepatic inflammation. *Front Immunol*. 2019; 10: 507. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00507.
23. Li H, Ding P, Nan Y, Wu Z, Hua N, Luo L, et al. Low expression of CD39 on monocytes predicts poor survival in sepsis patients. *J intensive care*. 2025; 13: 12. DOI: 10.1186/s40560-025-00784-0.
24. Duarte MM, Loro VL, Rocha JB, Leal DB, Bem AF, Dorneles A, et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides of patients with hypercholesterolemia and inflammatory processes. *FEBS J*. 2007; 274 (11): 2707–14. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05805.x.
25. Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, Papamarcaki T, Tsolas O, Drab M, et al. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *J Biol Chem*. 2005; 280 (28): 26406–14. DOI: 10.1074/jbc.M41392720014.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ мРНК, КОДИРУЮЩИХ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ SCFV-ФРАГМЕНТЫ АНТИТЕЛ К КОНСЕРВАТИВНЫМ ЭПИТОПАМ ВИРУСА ГРИППА

М. А. Плотникова, В. А. Олейник, С. А. Клотченко ✉

Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

Один из перспективных подходов к эффективной борьбе с гриппом — терапия с использованием моноклональных антител. Целью работы было провести оценку противовирусного действия внутриклеточных scFv-фрагментов антител, которые были трансфицированы в клетку в виде экзогенной мРНК, транслировались и были способны к высокоаффинному связыванию с вирусными антигенами непосредственно внутри клетки. В качестве вирусных мишеней были выбраны два белка вируса гриппа — гемагглютинин (антитело F16) и нуклеопротеин (антитело 2/3). Каждый из scFv-фрагментов, кодируемых мРНК, был получен в двух формах: с сигнальным пептидом (SP) для секреции во внеклеточное пространство (scFv-SP) и без него (scFv-WO) — для внутриклеточного функционирования в цитозоле. Показана различная локализация этих белков в клетке: scFv-SP обнаруживались в областях, характерных для эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи, в то время как scFv-WO были диффузно распределены по цитоплазме. Продемонстрировано, что мРНК, кодирующие scFv-F16-SP и scFv-2/3-SP, а также мРНК, кодирующая scFv-2/3-WO, проявляли противовирусное действие в отношении вируса гриппа А на клеточной модели. Наибольшим противовирусным эффектом обладала мРНК scFv-F16-SP: она приводила к снижению вирусной нагрузки относительно контроля примерно в 10 раз. В отношении вируса гриппа В обе мРНК, кодирующие scFv-2/3 (как с SP, так и без него), приводили к снижению вирусной нагрузки в среднем на 50% относительно контроля. Таким образом, показано, что внутриклеточные антитела обладают высоким противовирусным потенциалом и открывают возможности для воздействия на новые, перспективные вирусные мишени, которые ранее были недоступны для лекарственной терапии.

Ключевые слова: вирус гриппа, противовирусные препараты, антитела широкого спектра действия, пассивная иммунотерапия, технологии терапевтических мРНК, мРНК-кодируемые антитела, внутриклеточные антитела, scFv-фрагменты антител, вируснейтрализующая активность

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, Соглашение № 24-25-00488: «Изучение противовирусного потенциала внутриклеточных scFv антител к гриппу» (руководитель — С. А. Клотченко), <https://rscf.ru/project/24-25-00488/>.

Вклад авторов: М. А. Плотникова — разработка конструкций, проведение экспериментов, регистрация и анализ результатов, статистическая обработка, написание и оформление рукописи; В. А. Олейник — проведение экспериментов, регистрация результатов; С. А. Клотченко — дизайн исследования, получение и характеристика препаратов мРНК, проведение экспериментов, регистрация и анализ результатов, редактирование рукописи.

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

Статья получена: 27.11.2025 **Статья принята к печати:** 10.12.2025 **Опубликована онлайн:** 26.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.077

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/>).

ANTIVIRAL ACTIVITY OF mRNAs ENCODING INTRACELLULAR SCFV ANTIBODIES AGAINST CONSERVED INFLUENZA VIRUS EPITOPES

Plotnikova MA, Oleynik VA, Klotchenko SA ✉

Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

Monoclonal antibody therapy is one of the most promising approaches for effective influenza control. In this study, we evaluated the antiviral activity of exogenous mRNA-encoded single-chain variable fragment (scFv) antibodies, which are capable of binding viral antigens inside the cell with high affinity. Two influenza virus proteins, hemagglutinin (antibody F16) and nucleoprotein (antibody 2/3), were chosen as targets. Each scFv encoded by mRNA was produced in two variants: one containing a signal peptide (SP) to direct secretion into the extracellular space (scFv-SP) and one lacking the signal peptide (scFv-WO) for cytosolic localization and function. These variants showed distinct intracellular localization patterns: scFv-SP localized to regions characteristic of the endoplasmic reticulum and the Golgi complex, whereas scFv-WO was distributed diffusely throughout the cytoplasm. mRNAs encoding scFv-F16-SP, scFv-2/3-SP, and scFv-2/3-WO exhibited antiviral activity against influenza A virus *in vitro*. The scFv-F16-SP mRNA showed the strongest antiviral effect, reducing viral load by approximately tenfold compared to the control. For influenza B virus, both scFv-2/3 mRNA variants, with and without the signal peptide, reduced viral load by an average of 50%. These findings highlight the antiviral potential of intracellular antibodies and point to new opportunities for targeting viral components that are not accessible to conventional antiviral therapies.

Keywords: influenza virus, antiviral agents, broadly neutralizing antibodies, passive immunotherapy, mRNA therapeutics, mRNA-encoded antibodies, intrabodies, scFv fragments, virus neutralization

Funding: This study was funded by the Russian Science Foundation, project no. 24-25-00488 ‘Study of the antiviral potential of intracellular scFv antibodies against influenza virus’ (principal investigator — S. A. Klotchenko); <https://rscf.ru/project/24-25-00488/>

Author contribution: Plotnikova MA — design of structures, conducting experiments, registration and analysis of results, statistical processing, manuscript authoring and formatting; Oleynik VA — conducting experiments, registration of results; Klotchenko SA — study design, preparation and characterization of mRNA preparations, conducting experiments, registration and analysis of results, manuscript editing.

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

Received: 27.11.2025 **Accepted:** 10.12.2025 **Published online:** 26.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.077

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

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, вплоть до 2021 г. грипп оставался третьей по значимости причиной смерти от инфекций, вызывая до 350 тыс. смертей во всем мире [1]. Пандемия COVID-19 изменила эпидемиологию респираторных вирусных инфекций, однако на сегодняшний день грипп является весьма распространенной причиной возникновения тяжелых пневмоний, особенно у детей и людей старше 70 лет. Вирусы гриппа, обладающие высоким зоонозным потенциалом и способностью преодолевать межвидовые барьеры, несут в себе серьезную угрозу возникновения новых пандемий.

Современная стратегия противодействия гриппу в значительной степени основана на вакцинопрофилактике. Однако эффективность этого подхода ограничена сложностью прогнозирования штаммов, которые будут доминировать в следующем эпидемическом сезоне. Эти ограничения подчеркивают необходимость разработки новых терапевтических подходов.

Моноклональные антитела, благодаря своей способности специфично связываться с молекулярными мишенями и модулировать биологические функции, в том числе блокируя взаимодействия между белками, являются перспективными кандидатами для создания противовирусных препаратов. Существующие методы терапии с использованием моноклональных антител в значительной степени ограничены воздействием на внеклеточные мишени. Современные генно-инженерные подходы и технологии позволяют, тем не менее, оценить терапевтический потенциал внутриклеточного применения рекомбинантных антител или их фрагментов. Такая стратегия дает возможность использовать в качестве мишеней консервативные и функционально более уязвимые антигены вируса, обычно недоступные для стандартных терапевтических подходов.

В работах 1980–1990-х гг. было показано, что зрелые антитела стабильны и функциональны при введении их непосредственно в цитозоль [2–4], что открыло новые возможности использования антител для подавления функций антигенов внутри живых клеток. Так, два моноклональных антитела, специфично связывающих альфа- и бета-тубулин, в течение 1,5 ч после микроинъекции в живую клетку вызвали разрушение и агрегацию микрофиламентов [3].

Тем не менее системная доставка внутрь клетки достаточно крупных белков, таких как антитела, все еще представляет большую проблему [5]. Подход, основанный на использовании стабильной экспрессии моноклональных антител неиммунными клетками млекопитающих для инактивации антигенов непосредственно внутри клетки, кажется более перспективным [6].

Известно, что формирование правильной конформации антител обеспечивают шапероны, локализованные в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), куда цепи антител направляются посредством сигналов активного транспорта [7]. Еще в процессе синтеза белка на рибосоме локализованные на его N-конце сигнальные пептиды (SP), состоящие из 5–30 аминокислот, связываются сигнальной распознающей частицей, которая обеспечивает транслокацию растущей полипептидной цепи в просвет ЭПР [8, 9]. После прохождения через мембрану ЭПР сигнальный пептид расщепляется сигнальной пептидазой.

Отсутствие SP в полипептидных тяжелых и легких цепях рекомбинантного иммуноглобулина удержит антитело в цитозоле, однако с большой долей вероятности приведет к неправильному фолдингу и потере иммуноглобулином его функциональности [10, 11].

Селективные связывающие свойства с сохранением функциональности могут быть реализованы в более компактных форматах антител (28 кДа), таких как одноцепочечные вариабельные фрагменты (*single chain variable fragments*, scFv). Функциональные исследования продемонстрировали, что scFv способны правильно сворачиваться и собираться в цитозоле, даже несмотря на то, что шапероны, которые обычно помогают в этом процессе, локализованы исключительно в ЭПР, а восстановительная среда цитозоля не способствует образованию дисульфидных связей [12].

Цель данного исследования заключалась в разработке и оценке противовирусной активности синтетических мРНК, кодирующих высокоаффинные scFv-фрагменты антител против вируса гриппа. В качестве мишеней были выбраны два ключевых вирусных белка: поверхностный гемагглютинин и внутренний нуклеопротеин. При дизайне мРНК использовалась стратегия, предусматривающая либо секрецию scFv-фрагментов для нейтрализации вирусных частиц, либо их накопление в цитоплазме для подавления репликации вируса внутри инфицированной клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование scFv-фрагментов антител

Получение экспрессионных конструкций, кодирующих scFv-фрагменты антител F16 и 2/3, было выполнено нами ранее [13]. Для получения экзогенных мРНК фрагменты ДНК, кодирующие scFv нужной длины, были амплифицированы с использованием соответствующих праймеров («Евроген»; Россия) и вставлены методом рестрикции по сайтам *Bst*PA I/*Bmt* I («Сибэнзим»; Россия) с последующим лигированием в векторную систему pVTS3, которая была разработана в ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России на основе вектора pVIT (NovoPro Bioscience; Китай). Вектор pVTS3 содержит T7-промоторную область, 5'- и 3'-UTR, а также poly(dA/dT)-последовательность. Лигазные смеси были использованы для трансфекции компетентных клеток *E. coli* (штамм NEB Stable; NEB; Великобритания) с последующим высевом их на селективную (содержащую 100 мкг/мл ампициллина) агаризованную среду. Сформировавшиеся суточные колонии были проверены методом ОТ-ПЦР. Плазмиды со вставками нужного размера были накоплены в жидкой среде LB и очищены с использованием набора Plasmid Miniprep 2.0 («Евроген»; Россия). Последовательности разработанных плазмидных конструкций для получения экзогенных мРНК методом *in vitro* транскрипции были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру компанией «Евроген» (Россия).

In vitro транскрипция (IVT)

Препараты экзогенных мРНК были получены с использованием «Набора для синтеза мРНК *in vitro* (с ΨТР, m5CTP и m7GmAmG)» («Биолабмикс»; Россия). В качестве матрицы использовали 1 мкг плазмиды, предварительно линеаризованной по сайту Ahi I («Сибэнзим»; Россия). Реакцию проводили строго в соответствии с инструкцией к набору. После проведения реакции в смесь вносили 2 ед. TURBODNase (Thermo Fisher Scientific; США) и инкубировали еще 30 мин при 37 °С для расщепления двухцепочечной плазмидной ДНК. Полученный препарат мРНК очищали из реакционной смеси методом переосаждения в хлориде

лития. Концентрацию полученных экзогенных мРНК измеряли с использованием спектрофотометра NanoDrop ND-1000 и флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific; США).

Электрофорез в агарозном геле

Плазмидную ДНК (в том числе линейзованную) анализировали методом электрофореза в 0,8%-м агарозном геле в 1× TAE-буфере, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Образцы ДНК смешивали с 6× буфером для нанесения и загружали в лунки геля.

Для анализа целостности и качества мРНК использовали электрофорез в денатурирующем 1%-м агарозном геле. Подготовка образцов заключалась в смешивании 200–500 нг мРНК с Gel Loading Buffer II (Invitrogen; США) и термической денатурации (70 °С, 5 мин) перед внесением в гель, содержащий бромистый этидий. Разделение проводили в буфере MOPS при комнатной температуре.

Изображения гелей регистрировали с использованием системы визуализации Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad; США).

Трансфекция клеточных культур экзогенными мРНК

В работе использовали перевиваемые клеточные линии: A549 (карцинома легкого человека) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection; США; #CCL-185) и MDCK (клетки почки собаки) из коллекции IRR (International Reagent Resource; США; #FR58). Клетки A549 культивировали на питательной среде F12K (Gibco; США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров, SC (Gibco; США); MDCK — на среде альфа-MEM («Биолот»; Россия) с добавлением SC до 5%. Ведение культур и все эксперименты проводили без добавления антибиотиков.

Для трансфекции экзогенными мРНК использовали суточный 90–100% монослой клеток, ростовую среду непосредственно перед внесением мРНК заменяли на бессывороточную. Трансфекцию клеток проводили с использованием коммерческого трансфекционного реагента GenJector-U («Молекта»; Россия) согласно инструкции производителя. В лунки 96-луночного планшета липоплексы (комплексы РНК/трансфекционный агент) вносили в объеме 10 мкл, содержащем по 100 нг мРНК и 0,3 мкл трансфекционного реагента. В зависимости от задач эксперимента инкубацию клеток с липоплексами проводили в течение 2–48 ч при 37 °С и 5% CO₂.

Окраска эукариотических клеток для флуоресцентной микроскопии

Флуоресцентное окрашивание проводили через 24 ч после трансфекции экзогенными мРНК эукариотических клеток, рассеянных в лунки стеклянной слайд-камеры Lab-Tek II (Nunc; США). Для этого монослой клеток промывали DPBS, фиксировали 4%-м раствором параформальдегида в течение 10 мин и пермеабелизовали 0,1%-м раствором Triton X-100 (Sigma-Aldrich; США). Блокирование осуществляли раствором 1%-го бычьего сывороточного альбумина на DPBS в течение ночи при 4 °С. Окраску ядер проводили раствором DAPI (AppliChem; США), актинового цитоскелета — раствором фаллоидина, ковалентно связанного с родамином (Thermo Fisher Scientific; США). Для визуализации scFv-фрагментов антител использовали первичные мышиные моноклональные антитела Penta-His (Qiagen; США) к последовательности 6×His-tag в разведении 1 к 1000 и вторичные антитела Goat anti-Mouse,

меченные флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488, в конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Микроскопию клеток проводили с использованием системы визуализации клеток Cytell последовательно по каналам Blue, Green и Orange (GE Healthcare; США).

Имуноферментный анализ (ИФА)

Измерение уровня scFv-фрагментов антител в клеточной среде проводили методом ИФА. В качестве лиганда для сорбции использовали вирусный концентрат, разведенный в буфере PBS до концентрации 2 мкг/мл (штаммы вирусов гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm) и B/Phuket/3073/13 (Yamagata)). Растворы лигандов в объеме 100 мкл вносили в лунки 96-луночного планшета Microton High Binding (Greiner Bio-One; Германия) и инкубировали при температуре 4 °С в течение ночи (12–18 ч). После этого проводили трехкратную отмывку планшетов буфером PBST (PBS с добавлением Tween 20 до 0,05%) с использованием автоматического промывателя планшетов ELx405 (BioTek; США). Далее сорбирующую поверхность лунок блокировали 5%-м раствором сухого обезжиренного молока Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad; США) в PBST (далее «блокирующий реагент») в термостатической камере MB100-4A (Allsheng, Китай) при температуре 37 °С в течение 1 ч, по 200 мкл в лунку, и проводили отмывку. Затем в лунки микропланшета вносили тестируемые культуральные жидкости (КЖ) в объеме 100 мкл, разведенные один к двум на блокирующем реагенте, инкубировали при температуре 37 °С в течение 2 ч и проводили отмывку. Связавшиеся с антигеном scFv-фрагменты детектировали с использованием антител к последовательности 6×His-tag, конъюгированных с пероксидазой хрена, His17-HRP (Hytest; Россия), разведенных 1 к 2000 на блокирующем реагенте, при температуре 37 °С в течение 1 ч по 100 мкл в лунку. Далее проводили отмывку и проявляли пероксидазную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) («Хема»; Россия). После остановки цветной реакции добавлением в каждую лунку по 100 мкл 2N H₂SO₄ измеряли оптическую плотность при длинах волн 450 нм (OD₄₅₀) и 620 нм (OD₆₂₀) на микропланшетном спектрофотометре Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific; США). Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2010 (США) и GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США).

Вестерн-блоттинг

Для сбора клеточных лизатов MDCK использовали экстракционный буфер, содержащий два компонента — Extraction Buffer 5× PTR и Extraction Enhancer Buffer 50× (Abcam; США). По 50 мкл приготовленного охлажденного 1× экстракционного буфера добавляли в лунки к монослою отмывых DPBS клеток, планшет инкубировали в течение 30 мин на льду и собирали содержимое лунок в пробирки. Образцы осветляли в течение 30 мин при 4 °С и 13 800 g на центрифуге 5415R (Eppendorf; Германия). Полученный осветленный супернатант смешивали с денатурирующим буфером Лэммли, прогревали в течение 10 мин при 95 °С, вносили в лунки предзалитого геля Any kD Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gel (Bio-Rad; США) и разделяли в денатурирующих условиях. Далее для переноса геля на мембрану использовали систему полусухого блоттинга Trans-Blot Turbo Transfer System и наборы для блоттинга

Trans-Blot Turbo Mini 0.2 μm Nitrocellulose Transfer Packs, содержащие нитроцеллюлозную мембрану 0,2 мкм (Bio-Rad; США). Мембраны после переноса инкубировали в блокирующем реагенте в течение ночи при 4 °С, затем в течение 2 ч при 37 °С с первичными антителами Penta-His (Qiagen; США) к последовательности 6 \times His-tag, разведенными 1 к 2000 на блокирующем реагенте. После этого мембрану отмывали в PBST и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С со вторичными антителами Goat anti-Mouse, конъюгированными с пероксидазой хрена, GAM-HRP (Bio-Rad; США), разведенными 1 к 2000 на блокирующем реагенте. Проявку белков осуществляли с использованием субстрата для хемилюминесцентной детекции вестерн-блоттинга Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad; США), регистрацию результатов проводили на системе визуализации ChemiDoc MP (Bio-Rad; США). В качестве отрицательного контроля использовали лизат клеток, трансфицированных мРНК, которая кодировала тяжелую цепь иммуноглобулина к нерелевантному антигену.

Противовирусные эксперименты

Для оценки противовирусного действия экзогенных мРНК, кодирующих scFv-фрагменты антител, была использована лечебно-профилактическая схема. Для этого суточный монослой клеток MDCK промывали стерильным раствором DPBS (для удаления компонентов сыворотки, ингибирующей репродукцию вируса), а затем в лунки вносили по 100 мкл свежей среды альфа-MEM («Биолот»; Россия), содержащей по 10 мкл липоплексов, которые были приготовлены с использованием коммерческого трансфекционного реагента GenJector-U («Молекта»; Россия) согласно инструкции производителя. На 1 лунку 96-луночного планшета (примерно 5×10^4 клеток) приходилось по 100 нг мРНК и 0,3 мкл трансфекционного реагента. Далее клетки инкубировали 6 ч при температуре 37 °С и 5% CO_2 .

Инфицирование проводили методом контакта клеток с 50 мкл вирусосодержащей среды в течение 1 ч при температуре 37 °С и 5% CO_2 . В работе использовали эталонные штаммы вирусов гриппа человека из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России: A/California/07/09 (H1N1pdm), A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2), B/Phuket/3073/13 (Yamagata) и B/Malaysia/2506/2004 (Victoria) с исходными инфекционными титрами 6×10^8 TCID₅₀/мл; $3,16 \times 10^7$ TCID₅₀/мл; $3,16 \times 10^6$ TCID₅₀/мл и $1,0 \times 10^8$ TCID₅₀/мл соответственно.

Для инфицирования использовали разведения вирусов 1 к 1000, что соответствовало множественности заражения от 0,1 до 1 MOI.

После инкубации вирусосодержащую жидкость удаляли и на клетки наслаивали исходную трансфекционную среду, содержащую липоплексы. После инфицирования клетки инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 °С и 5% CO_2 . Далее проводили детекцию вирусных частиц: в КЖ с использованием реакции гемагглютинации по стандартной методике [14], в клетках — методом внутриклеточного ИФА (*In-Cell ELISA*).

Внутриклеточный ИФА

Оценку содержания вирусных частиц в клетках проводили методом внутриклеточного ИФА, следуя описанному выше протоколу ИФА с небольшими изменениями. Если коротко, то 96-луночные планшеты с зараженными клетками

фиксируют 80%-м ацетоном в DPBS по 50 мкл в лунку в течение 30 мин при температуре 4 °С. После промывки PBST лунки инкубировали в блокирующем реагенте при температуре 37 °С в течение 1 ч, по 200 мкл в лунку, и проводили отмывку. Затем в лунки микропланшета вносили первичные мышинные моноклональные антитела против нуклеопротеина вирусов гриппа А и В [15], разведенные до концентрации 0,5 мкг/мл на блокирующем реагенте, по 100 мкл в лунку, инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч и проводили отмывку. Связавшиеся с вирусными частицами антитела детектировали с использованием вторичных антител Goat anti-Mouse, конъюгированных с пероксидазой хрена, GAM-HRP (Bio-Rad; США), разведенных 1 к 2000 на блокирующем реагенте, по 100 мкл в лунку при температуре 37 °С в течение 1 ч и проводили отмывку. Проявку и учет результатов осуществляли аналогично описанному выше методу ИФА.

Статистическая обработка результатов

Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США) с использованием одношагового анализа ANOVA с тестом Холма-Шидака для множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование и получение экзогенных мРНК, кодирующих scFv-фрагменты антител

В качестве объектов исследования были выбраны антигенраспознающие участки антител в формате scFv, разработанные нами ранее [13]. В частности, один из них, а именно scFv-FI6 — специфически выявляет стеблевой участок гемагглютинина (HA), консенсусный для вирусов гриппа А (ВГА) обеих филогенетических групп [16], второй, scFv-2/3 — специфично связывает нуклеопротеины (NP) вирусов гриппа В (ВГВ) обеих генетических линий [17].

scFv содержали переменные домены исходных полноразмерных рекомбинантных антител в направлении от фрагмента легкой цепи к тяжелой, соединенные линкером, состоящим из четырех тандемных копий G₄S. Для секреции во внеклеточное пространство N-конец каждого scFv-фрагмента содержал сигнальный пептид (SP) из соответствующей легкой цепи исходного антитела (их обозначили как scFv-SP). В качестве SP были использованы следующие аминокислотные последовательности: MKSQTQVLVFLLLCVSGAHG — для scFv-FI6-SP и MDFVQVQIFSLLISASVILSRG — для scFv-2/3-SP. Для накопления внутри клетки каждый из scFv-фрагментов был также сконструирован в виде полипептида без SP (scFv-WO). Открытая рамка считывания (ORF) таких scFv-фрагментов начиналась со стартового кодона ATG, кодирующего метионин, после которого встыв начиналась последовательность, кодирующая переменный домен легкой цепи. scFv-SP и scFv-WO отличались только наличием или отсутствием SP на N-конце. Все рекомбинантные scFv-фрагменты антител были снабжены C-концевыми гексагистидиновыми метками для последующей детекции (рис. 1А, Б). На основе разработанного дизайна последовательностей были получены плазмидные конструкции, содержащие

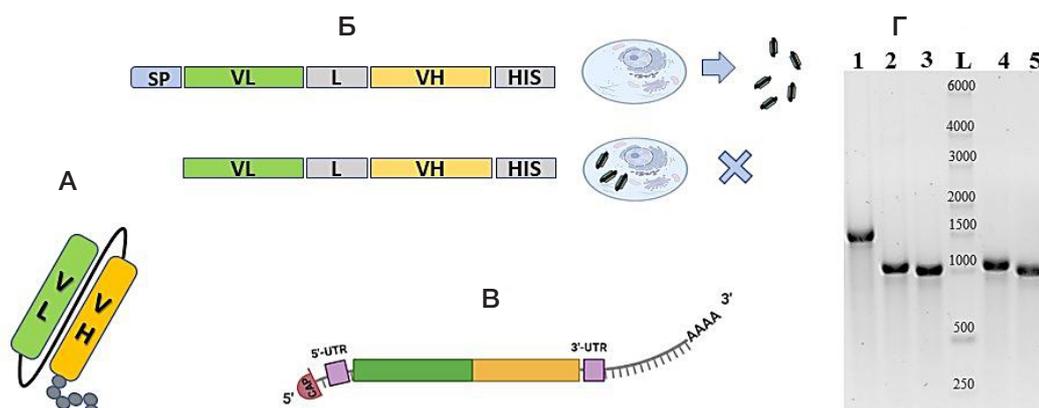


Рис. 1. Принципиальное строение разработанных scFv-фрагментов антител против вирусов гриппа А и В и кодирующих их экзогенных мРНК. **А.** Структура scFv-фрагмента антитела, состоящего из переменных доменов легкой (показан зеленым цветом) и тяжелой (показан оранжевым цветом) цепей. Черной линией отмечен линкерный пептид (G₄S)₄. Серыми кружками показана последовательность 6×His-tag на С-конце белка. **Б.** Структура кодирующих областей секретируемого (верхняя цепь) и цитозольного scFv. Принципиальным различием является наличие (или отсутствие) SP на N-конце. VL, VH — переменные домены легкой и тяжелой цепей соответственно, L — линкерный пептид, HIS — последовательность 6×His-tag. **В.** Структура экзогенной мРНК, используемой для трансляции внутриклеточных scFv: на 5'-конце отмечен кэп (в работе использован m7GmAmG), далее сиреневым цветом обозначена 5'-UTR регуляторная область, зеленым и оранжевым блоками — структура кодирующей области scFv, вторым сиреневым блоком — 3'-UTR регуляторная область и протяженной серой линией с насечками — поли(А)-хвост. **Г.** Результат электрофоретического разделения полученных и очищенных препаратов экзогенных мРНК: 1 — мРНК, кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулина к нерелевантному антигену (NC-RNA), расчетной длиной 1792 н.; 2 — мРНК, кодирующая scFv-FI6-SP, длиной 1219 н.; 3 — мРНК, кодирующая scFv-FI6-WO, длиной 1162 н.; 4 — мРНК, кодирующая scFv-2/3-SP, длиной 1201 н.; 5 — мРНК, кодирующая scFv-2/3-WO, длиной 1138 н. L — маркер молекулярного веса PHK RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Длины маркера (н.) подписаны на дорожке

T7-промоторный участок для получения мРНК методом *in vitro*-транскрипции (IVT).

Технология мРНК была использована для трансляции внутриклеточных scFv-фрагментов антител в неиммунных клетках эукариот. мРНК была получена методом IVT и состояла из пяти стандартных элементов: на 5'-конце оптимизированный аналог кэп-структуры m7GmAmG (CleanCap; TriLink BioTechnologies; США), далее 5'-нетранслируемая область (UTR), потом ORF scFv, 3'-UTR и поли(А)-хвост, кодируемый встроенной в плазмиду poly(dA/dT)-последовательностью (рис. 1В). Для снижения иммуногенности и повышения стабильности мРНК содержала модифицированные нуклеотиды, такие как псевдоуридин (ΨTP) и 5-метилцитидин (m5CTP).

Полученные и очищенные препараты: четыре мРНК, кодирующие scFv-фрагменты антител FI6 и 2/3 против ВГА и ВГВ, с SP и без него, а также еще одна мРНК, используемая далее в экспериментах в качестве отрицательного контроля и кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулина к нерелевантному антигену, — были охарактеризованы спектрофотометрически и электрофоретически в агарозном геле (рис. 1Г). Было показано, что длины мРНК соответствовали расчетным, а чистота и целостность полученных мРНК были достаточными для эффективной трансляции целевых белков.

Функциональные свойства scFv-фрагментов антител, кодируемых экзогенными мРНК

Мы оценили трансляционную активность полученных экзогенных мРНК, кодирующих scFv-фрагменты антител, в эукариотических клеточных линиях MDCK и A549. Для этого через 24 ч после трансфекции мРНК отбирали КЖ, а клетки подвергали лизису и оценивали в лизатах уровень белков с гистидиновой меткой методом вестерн-блоттинга.

Через 24 ч после трансфекции клеток MDCK мРНК, кодирующей scFv-SP, в КЖ с использованием антител к последовательности 6×His-tag нам удалось достоверно детектировать белки ожидаемой молекулярной массы

(~28 кДа), соответствующие мономерным scFv-фрагментам антител (рис. 2А). Детекция scFv-продуктов в клеточных лизатах была затруднена: как в случае scFv-SP, так и scFv-WO, были выявлены неспецифические высокомолекулярные полосы (~55 кДа), присутствующие и в отрицательном контроле. Ферментативная амплификация сигнала и значительное увеличение времени выдержки позволили выявить внутри клетки продукцию scFv-SP (рис. 2А, дорожка 3), но не scFv-WO (рис. 2А, дорожка 4). Таким образом, трансфекция мРНК, кодирующей scFv-SP, приводила через 24 ч к секреции зрелых scFv-фрагментов в мономерной форме, которые обнаруживались как в КЖ, так и в клеточных лизатах.

Предполагая, что внутриклеточные scFv-фрагменты антител могут быть нестабильны, а период их полувыведения может достигать всего нескольких часов, мы исследовали их продукцию в клеточных лизатах в динамике: через 2, 4, 6, 8 и 12 ч после трансфекции клеток экзогенными мРНК. Было показано, что пик трансляции для обоих scFv (как с сигналом секреции, так и без него) наблюдался через 6 ч после трансфекции мРНК (рис. 2Б). При этом периоды полувыведения внутриклеточных scFv существенно различались в зависимости от наличия или отсутствия SP. Так, антитела scFv-SP были выявлены в клетках уже через 2 ч после трансфекции, далее наблюдали возрастание их продукции к 6 ч и резкое снижение к 12 ч. В случае scFv-WO белок обнаруживался в клетках на минимально детектируемом уровне через 4 ч после трансфекции, его количество достигало пика к 6 ч, а через 8 ч снижалось до предела детекции метода.

Далее мы оценили динамику накопления фрагментов scFv-SP в КЖ от клеток A549, трансфицированных соответствующими экзогенными мРНК (рис. 2В). Для этого был проведен ИФА, в котором в качестве захватывающих лигандов выступали вирусные концентраты, представляющие собой очищенные инактивированные вирусы гриппа А и В. Детекцию проводили с использованием антител к последовательности 6×His-tag, конъюгированных с пероксидазой хрена. Концентрации scFv-фрагментов антител были оценены по калибровочной кривой,

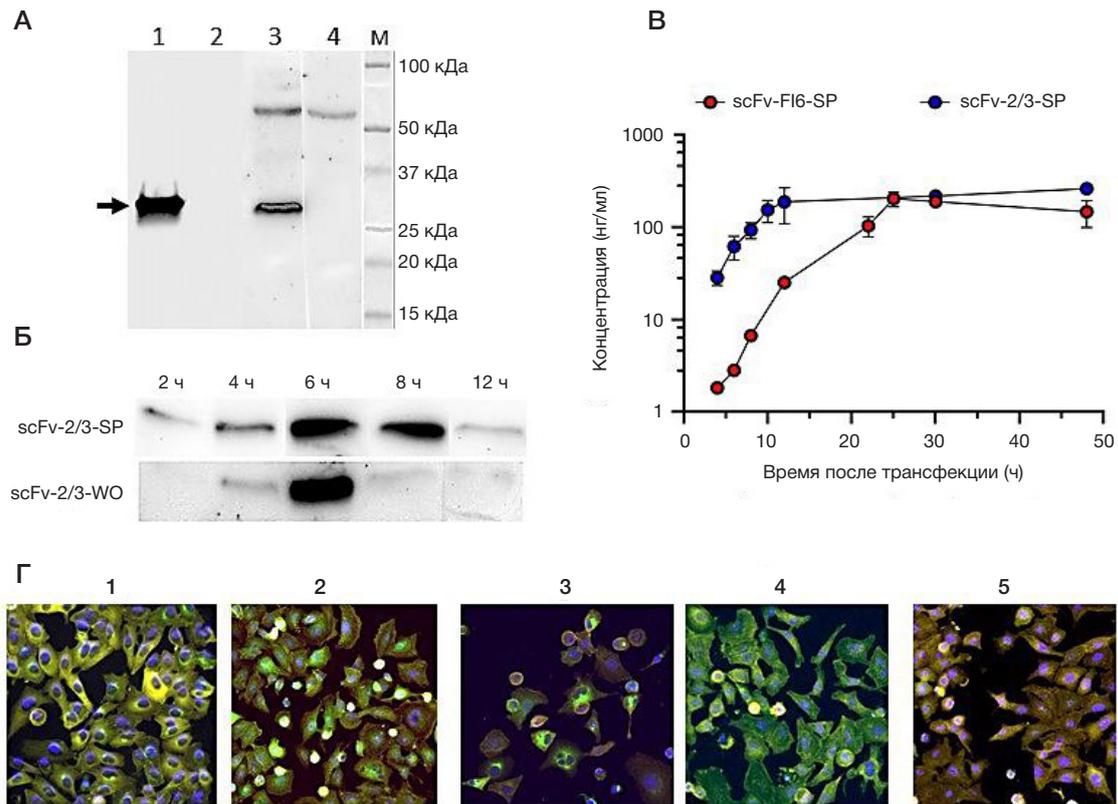


Рис. 2. Трансляционная активность экзогенных мРНК, кодирующих цитозольную (WO) и секретируемую (SP) формы scFv-фрагментов антител против вирусов гриппа А и В. **А.** Результаты вестерн-блоттинга scFv-2/3 фрагментов антител в культуральной жидкости (КЖ) и лизатах клеток MDCK с использованием антител к последовательности 6×His-tag (аналогичные результаты по scFv-FI6 не представлены). Дорожки 1, 2 — КЖ от клеток MDCK, трансфицированных мРНК, кодирующими scFv-2/3-SP и scFv-2/3-WO соответственно; дорожки 3, 4 — клеточные лизаты, полученные при трансфекции клеток мРНК, кодирующими scFv-2/3-SP и scFv-2/3-WO соответственно; М — белковый маркер молекулярного веса Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad; CLUJA), справа от дорожки подписаны соответствующие молекулярные массы в кДа. Все образцы были взяты через 24 ч после трансфекции клеток мРНК. **Б.** Результаты вестерн-блоттинга scFv-2/3 фрагментов антител в лизатах клеток MDCK в динамике с использованием антител к последовательности 6×His-tag. Верхняя панель — внутриклеточная продукция scFv-2/3-SP, нижняя — scFv-2/3-WO. Сверху в часах отмечено время отбора проб после трансфекции клеток мРНК. **В.** Кривые накопления scFv-фрагментов антител в КЖ после трансфекции клеток А549 мРНК, кодирующими scFv-FI6-SP (показаны красными точками) и scFv-2/3-SP (показаны синими точками). Результаты были получены методом ИФА. Точками показаны средние значения концентраций, рассчитанные для двух биологических повторов, ±СО. **Г.** Репрезентативные изображения, полученные в результате флуоресцентной микроскопии фиксированных препаратов клеток А549, трансфицированных экзогенными мРНК, кодирующими: 1 — scFv-FI6-SP, 2 — scFv-FI6-WO, 3 — scFv-2/3-SP, 4 — scFv-2/3-WO и 5 — NC-RNA. Визуализацию актинового цитоскелета (показан желтым цветом) проводили родаминофаллоидином, клеточных ядер (показаны синим цветом) — хромосомным красителем DAPI. Для визуализации scFv-фрагментов (показаны зеленым цветом) использовали первичные мышинные моноклональные антитела к последовательности 6×His-tag с их последующим выявлением вторичными антителами Goat anti-Mouse, меченными флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488. Изображения были получены с использованием системы визуализации клеток Cytell (40× увеличение), на этапе обработки (с использованием встроенного ПО) отдельные каналы изображения были псевдоокрашены в цвета RGB, на рисунке представлены увеличенные изображения

построенной с использованием рекомбинантных препаратов scFv, очищенных нами ранее [13].

Согласно полученным нами результатам уже через 2 ч после трансфекции клеток А549 мРНК, кодирующими scFv-SP, в КЖ выявлялись функциональные scFv-фрагменты антител на аналитически детектируемом уровне. Далее в течение суток происходил равномерный прирост уровня scFv, и к 24 ч концентрация как scFv-FI6-SP, так и scFv-2/3-SP достигала примерно 200 нг/мл. Насыщение и выход на «плато» уровня белкового продукта, кодируемого экзогенной мРНК, происходили примерно через 24 ч после трансфекции, содержание белков в КЖ определялось на протяжении всего срока наблюдений (48 ч).

Для оценки внутриклеточной локализации белков, кодируемых scFv-SP и scFv-WO, была проведена иммунофлуоресцентная окраска клеток А549, трансфицированных соответствующими экзогенными мРНК (рис. 2Г). Иммуноцитохимический анализ показал, что scFv-FI6-WO и scFv-2/3-WO были диффузно распределены по цитоплазме клеток и не имели четкой локализации. Напротив, для scFv-FI6-SP и scFv-2/3-SP была характерна

четкая локализация в перинуклеарной области, что с большой долей вероятности отражает их накопление преимущественно в ЭПР (который не окрашивали).

На заключительном этапе исследования мы оценили противовирусные свойства полученных экзогенных мРНК в отношении вирусов гриппа А и В. В качестве отрицательного контроля была использована мРНК, кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулина к нерелевантному антигену (NC-RNA).

Эксперименты были проведены по лечебно-профилактической схеме с контактом вирусов в течение 1 ч. Согласно полученным нами результатам три мРНК, кодирующие scFv-FI6-SP, scFv-2/3-SP и scFv-2/3-WO, проявляли противовирусное действие в отношении ВГА (рис. 3А). При этом в случае штамма H1N1pdm наибольшим противовирусным эффектом обладала мРНК scFv-FI6-SP, предварительная трансфекция которой до заражения приводила к снижению вирусной нагрузки примерно в 10 раз относительно контроля. В случае штамма H3N2 подобной тенденции не наблюдалось: противовирусное действие всех трех мРНК было сопоставимо и приводило к снижению вирусной нагрузки до 60–70% относительно

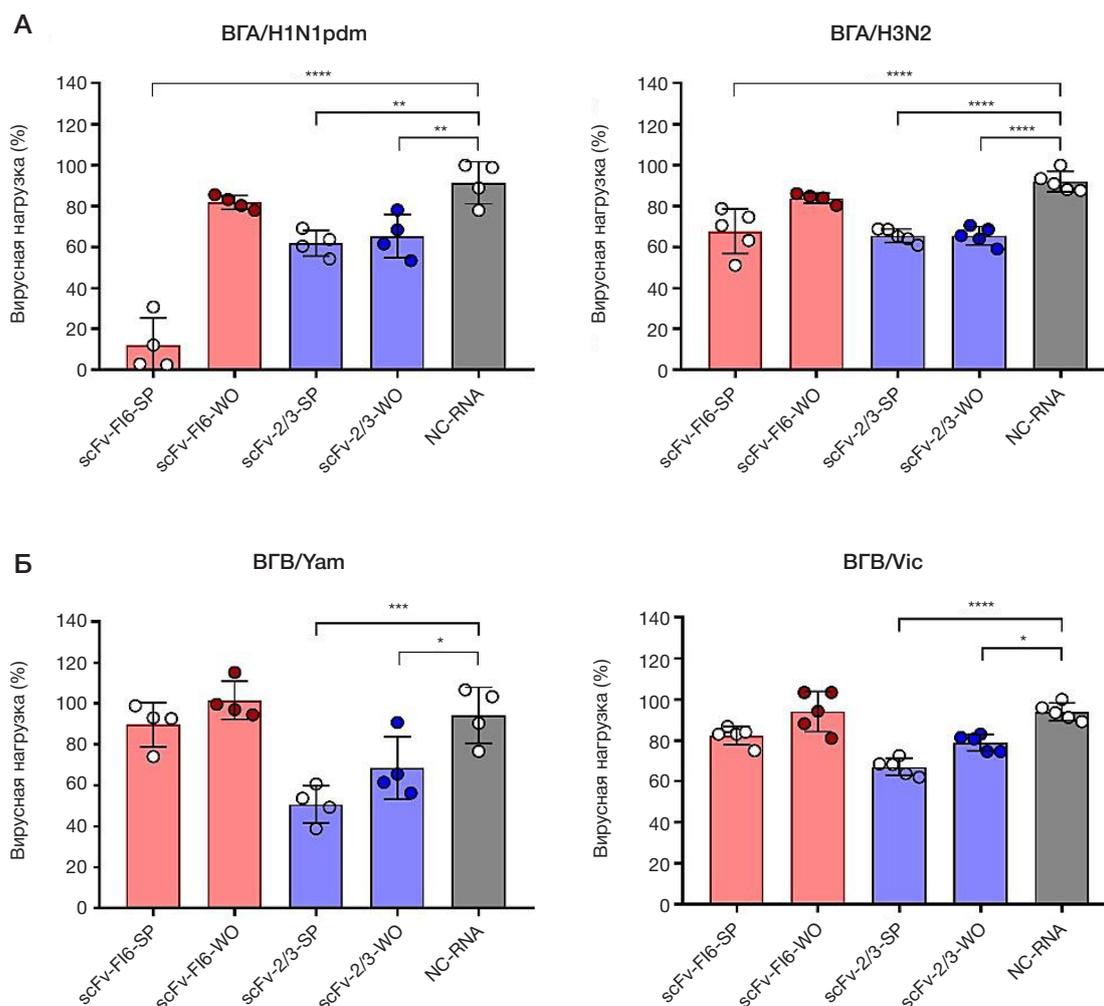


Рис. 3. Противовирусная активность экзогенных мРНК, кодирующих цитозольную (WO) и секретируемую (SP) формы scFv-фрагментов антител против вирусов гриппа А и В. Результаты были получены методом внутриклеточного ИФА. **А.** Графики, отражающие внутриклеточный уровень ВГА при инфицировании штаммами вируса гриппа А/California/07/09 (H1N1pdm) (слева) и А/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2) (справа). **Б.** Графики, отражающие внутриклеточный уровень ВГВ при инфицировании штаммами вируса гриппа В/Phuket/3073/13 (Yamagata) (слева) и В/Malaysia/2506/2004 (Victoria) (справа). Цветными столбиками показаны средние значения по выборке ($n = 4$) \pm СО: красными — при лечебно-профилактическом введении экзогенных мРНК, кодирующих scFv-фрагменты к НА ВГА; синими — при лечебно-профилактическом введении экзогенных мРНК, кодирующих scFv-фрагменты к NP ВГВ; серым столбиком показаны средние значения для клеток, которым по лечебно-профилактической схеме вводили экзогенную мРНК, кодирующую тяжелую цепь иммуноглобулина к нерелевантному антигену (отрицательный контроль). Для расчета статистической достоверности выявленных различий использовали одношаговый анализ ANOVA с тестом Холма–Шидака для множественных сравнений. Звездочками отмечены достоверные различия, выявленные при сравнении соответствующей группы с NC-RNA: * — $P_{\text{value}} < 0,0332$; ** — $P_{\text{value}} < 0,0021$; *** — $P_{\text{value}} < 0,0002$; **** — $P_{\text{value}} < 0,0001$

контроля. Примечательно, что мРНК scFv-F16-WO, специфично связывающая НА ВГА, не оказывала никакого эффекта на репродукцию ВГА.

В отношении ВГВ обе мРНК, кодирующие scFv-2/3 (как с SP, так и без него), проявляли противовирусное действие — их предварительная трансфекция до заражения приводила к снижению вирусной нагрузки до 50–70% относительно контроля. В целом, паттерны противовирусной активности мРНК в отношении штаммов ВГВ Ямагатской и Викторианской линии были сопоставимы. Важно отметить, что изначально ни исходное полноразмерное моноклональное антитело 2/3 [17], ни полученный на его основе белковый фрагмент scFv-2/3 не обладали нейтрализующим действием в отношении ВГВ [13].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Современная пассивная иммунотерапия с использованием нейтрализующих моноклональных антител может обеспечить широкую защиту от инфекций, вызываемых вирусами гриппа [16, 18, 19]. Существующие на

сегодняшний день терапевтические иммуноглобулины направлены к поверхностным антигенам вируса гриппа — гемагглютинуину и нейраминидазе. Вместе с тем, использование антител к белкам-мишеням, обладающим высокой скоростью изменчивости, несет в себе значительные риски [20, 21]. В связи с этим выбор в качестве мишеней других вирусных антигенов, обладающих большей консервативностью, представляется весьма перспективным.

Целью нашего исследования была оценка потенциала применения внутриклеточных терапевтических антител, нацеленных на две различных мишени вируса гриппа: поверхностный гемагглютинин, уязвимый для нейтрализующих антител, и внутренний белок нуклеопротеин, недоступный для блокирования в составе зрелого вириона. Попытки введения моноклональных антител в цитозоль живых клеток и исследования их функциональных свойств предпринимаются с 70-х годов прошлого столетия [22–24]. Однако лишь в последнее десятилетие, с развитием технологий на основе мРНК, позволяющих эффективно экспрессировать антитела непосредственно внутри клетки, появилась реальная

возможность применения внутриклеточных антител в качестве терапевтического средства.

Известно, что полноразмерные иммуноглобулины наряду с антигенсвязывающей областью содержат Fc-домен, обладающий эффекторными функциями, обеспечивающими взаимодействие антитела с клетками иммунной системы [25, 26]. Очевидно, что для специфичного связывания антитела с мишенью внутри клетки такая функция является избыточной. Поэтому для оценки внутриклеточного действия нами был выбран формат scFv-фрагмента антитела [27, 28], содержащий только его переменные домены. Кроме того, для каждого из антител (scFv-F16, направленного против HA ВГА, и scFv-2/3, направленного против NP ВГВ) мы разработали два типа конструкций. Первая конструкция содержала последовательность SP, обеспечивающего транслокацию полипептидной цепи в просвет ЭПР, далее в аппарат Гольджи и секрецию белка во внеклеточное пространство. Вторая конструкция не содержала SP и каких-либо других сигнальных последовательностей, таких как сигнал ядерной локализации, сигнал локализации в ЭПР и др. [8, 9]. По нашим предположениям, белковый продукт, транслируемый с такой экзогенной мРНК, должен оставаться в цитозоле и эффективно взаимодействовать там с белками-мишенями, подавляя репродукцию вируса.

Нам удалось выявить различия в распределении полученных scFv-фрагментов антител внутри клетки. scFv-SP главным образом были сосредоточены в областях с сильно изогнутыми гладкими мембранами, типичными для пограничной области ЭПР/Гольджи. Напротив, scFv-WO не имели четкой локализации и были диффузно распределены по цитоплазме. Вероятно, после трансляции они оставались в цитозоле и не вовлекались в везикулярный транспорт.

Следует отметить, что при анализе клеточных лизатов методом вестерн-блоттинга через 24 ч после трансфекции мРНК, кодирующей scFv-WO, в отличие от scFv-SP, нам не удалось обнаружить белки, соответствующие мономерным scFv-фрагментам антител (~28 кДа). В то же время в КЖ после трансфекции как мРНК scFv-F16-SP, так и scFv-2/3-SP мы достоверно выявили белки ожидаемой молекулярной массы.

Далее мы показали, что внутриклеточные scFv-фрагменты антител обладают быстрым периодом полувыведения. Фактически продукты мРНК, кодирующей scFv-WO, обнаруживались лишь в течение 4 ч, что свидетельствует о быстрой деградации этих белков, по-видимому, посредством убиквитин-протеасомной системы. Многочисленные исследования показывают, что цитозольные scFv-фрагменты часто демонстрируют низкую стабильность, склонны к образованию димеров и деградации [29]. Это связано с неоптимальными для фолдинга антител условиями в цитозоле: низким pH, отсутствием шаперонов и восстановительной средой, которая препятствует формированию стабилизирующих дисульфидных связей [11, 12, 30]. Таким образом, эффективность применения внутриклеточных scFv-фрагментов в цитозоле может быть существенно снижена из-за сложностей с фолдингом в неоптимальных условиях, что препятствует образованию стабильной функциональной конформации [31]. Интересно отметить, что внутриклеточная продукция scFv-фрагментов антител, содержащих сигнал секреции, инициировалась раньше и была более продолжительна.

Следующим этапом работы стала оценка противовирусной активности сконструированных и полученных нами

экзогенных мРНК, кодирующих scFv-фрагменты антител, на клеточной модели гриппозной инфекции. Известно, что экзогенные мРНК способны неспецифически подавлять репродукцию вируса за счет собственной иммуногенности и активации клеточных сенсоров нуклеиновых кислот [32, 33]. В связи с этим в качестве негативного контроля неспецифических эффектов мы использовали мРНК, кодирующую тяжелую цепь иммуноглобулина против нерелевантного антигена (с SP), полученную и очищенную так же, как исследуемые препараты.

Нами было показано, что из двух конструкций, кодирующих цитозольный и секретируемый белок scFv-F16 (специфично связывающий HA ВГА), противовирусным действием обладала только мРНК, кодирующая scFv-F16-SP. Лечебно-профилактическое применение такой мРНК снижало вирусную нагрузку при заражении H1N1pdm почти в 10 раз по сравнению с препаратом сравнения. Противовирусный эффект scFv-F16-WO нами выявлен не был. По-видимому, использование внутриклеточных антител более эффективно, когда их мишенью служат белки того же секреторного пути. Показано, что внутриклеточное человеческое антитело в формате scFv против HA, экспрессируемое с плазмидной ДНК, подавляло репродукцию вируса гриппа H5N1 *in vitro*. При этом *in vivo* его эффективность значительно возросла в комбинации с внеклеточным IgG1, содержащим идентичные переменные домены [34].

Для scFv-2/3, направленного против NP ВГВ и не обладающего нейтрализующими свойствами [13], результаты оценки противовирусной активности оказались неожиданными. Обе формы белка — как цитозольная, так и секретируемая — при лечебно-профилактическом применении проявляли противовирусные свойства, снижая вирусную нагрузку ВГВ в среднем в 2 раза по сравнению с контролем. Трансфекция экзогенных мРНК, кодирующих scFv-2/3, также приводила к подавлению репродукции ВГА. Поскольку исходное полноразмерное моноклональное антитело 2/3 не обладает нейтрализующей активностью [17], идентификация его эпитопа на молекуле NP ВГВ затруднена. Можно предположить, что данный эпитоп высококонсервативен у вирусов гриппа А и В. Таким образом, экспрессия экзогенных мРНК, кодирующих scFv-2/3, приводила к снижению репродукции как ВГВ, так и ВГА, в среднем на 50% относительно контроля.

Следует отметить, что описано использование внутриклеточных антител против NP ВГА, подавляющих репродукцию вируса за счет блокирования взаимодействия NP с белками PB1 и PB2 вирусной полимеразы, которая играет критически важную роль в транскрипции и репликации вируса [35]. В другой работе описаны однодоменные антитела ламы против различных эпитопов NP ВГА, которые ингибировали репликацию вируса, блокируя ядерный импорт его рибонуклеопротеиновых комплексов, ответственных за ядерный транспорт, транскрипцию, репликацию и упаковку вирусного генома в новые вирионы [36]. Важно подчеркнуть, что в обоих исследованиях экспрессию внутриклеточных антител осуществляли не с помощью экзогенных мРНК, а путем трансфекции клеток плазмидными конструкциями, кодирующими эти антитела.

Наше исследование показало, что эффективность структурно различных внутриклеточных scFv-фрагментов антител зависит от пути внутриклеточного транспорта их вирусных белков-мишеней. Полученные нами данные

позволяют предположить, что ингибирование функций некоторых вирусных белков возможно только при воздействии на них в строго определенных клеточных компартаментах.

Таким образом, использование экзогенных мРНК, кодирующих высокоаффинные scFv-фрагменты антител против консервативных внутриклеточных вирусных белков (в частности, нуклеопротеина вируса гриппа), представляет собой перспективную стратегию подавления репродукции вируса. Главное преимущество этого подхода — нацеливание на внутренние вирусные белки, в том числе внутриклеточные комплексы репликации-транскрипции вируса, которые значительно более консервативны и в меньшей степени подвержены антигенному дрейфу, чем поверхностные гликопротеины [37].

Выводы

В представленной работе: 1) сконструированы scFv-фрагменты антител к гемагглютининому вируса гриппа А и нуклеопротеину вируса гриппа В; 2) получены экзогенные мРНК, кодирующие эти scFv-фрагменты антител в двух формах — цитозольной и секретируемой; 3) подтверждена эффективная трансляция белковых продуктов scFv при трансфекции экзогенных мРНК в эукариотические клеточные системы; 4) показаны диффузное внутриклеточное распределение цитозольных форм и преимущественная локализация в эндоплазматическом ретикулуме секретируемых форм scFv-фрагментов антител; 5) показано противовирусное действие экзогенных мРНК, кодирующих scFv-фрагменты антител, в отношении вирусов гриппа А и В.

Литература

- Bender RG, et al. Global, regional, and national incidence and mortality burden of non-COVID-19 lower respiratory infections and aetiologies, 1990–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Infectious Diseases*. 2024; 24 (9): 974–1002. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00176-2).
- Lin JJ, Feramisco JR. Disruption of the in vivo distribution of the intermediate filaments in fibroblasts through the microinjection of a specific monoclonal antibody. *Cell*. 1981; 24 (1): 185–93. Available from: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90514-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90514-6).
- Blose SH, Meltzer DI, Feramisco JR. 0-nm Filaments Are Induced to Collapse in Living Cells Microinjected with Monoclonal and Polyclonal Antibodies Against Tubulin. *Journal of Cell Biology*. 1984; 98: 847–58. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.98.3.847>.
- Kallajoki M, et al. Microinjection of a monoclonal antibody against SPN antigen, now identified by peptide sequences as the NuMA protein, induces micronuclei in Ptk2 cells. *Journal of Cell Science*. 1993; 104 (1): 139–50. Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.104.1.139>.
- Rabbitts TH. Intracellular Antibodies for Drug Discovery and as Drugs of the Future. *Antibodies*. 2023; 12 (1). Available from: <https://doi.org/10.3390/antib12010024>.
- Biocca S, Neuberger MS, Cattaneo A. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *The EMBO Journal*. 1990; 9 (1): 101–8. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08085.x>.
- Marschall ALJ, Dübel S, Böldicke T. Recent advances with ER targeted intrabodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 917: 77–93. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8_5.
- Gerondopoulos A, et al. A signal capture and proofreading mechanism for the KDEL-receptor explains selectivity and dynamic range in ER retrieval. *eLife*. 2021; 10. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.68380>.
- Johnson AE, Van Waes MA. The Translocon: A Dynamic Gateway at the ER Membrane. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999; 15 (1): 799–842. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.799>.
- Haryadi R, et al. Optimization of Heavy Chain and Light Chain Signal Peptides for High Level Expression of Therapeutic Antibodies in CHO Cells. *PLoS one*. 2015; 10 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116878>.
- Marschall ALJ, et al. Targeting antibodies to the cytoplasm. *mAbs*. 2011; 3 (1): 3–16. Available from: <https://doi.org/10.4161/mabs.3.1.14110>.
- Richardson JH, Wayne MA. Intracellular antibodies: development and therapeutic potential. *Trends in biotechnology*. 1995; 13 (8): 306–10. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88970-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88970-2).
- Плотникова М. А., и др. scFv-фрагменты рекомбинантных антител к вирусу гриппа: получение и характеристика функциональной активности. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. Принято к публикации 12.12.2025. Available from: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-728>.
- Killian ML. Hemagglutination assay for influenza virus. *Animal influenza virus. Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology*. 2014; 1161: 3–9. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_1.
- Plotnikova MA, et al. Antibody microarray immunoassay for screening and differential diagnosis of upper respiratory tract viral pathogens. *Journal of Immunological Methods*. 2020; 478: 112712. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112712>.
- Corti D, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*. 2011; 333 (6044): 850–6. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1205669>.
- Krivitskaya VZ, et al. Detection and Differentiation of Current Influenza B Viruses by the Microculture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2023; 59 (7): 1039–46. Available from: <https://doi.org/10.1134/S0003683823070037>.
- Biswas M, et al. Broadly neutralizing antibodies for influenza: Passive immunotherapy and intranasal vaccination. *Vaccines*. 2020; 8 (3): 424. Available from: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030424>.
- Momont C, et al. A pan-influenza antibody inhibiting neuraminidase via receptor mimicry. *Nature*. 2023; 618 (7965): 590–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06136-y>.
- Heaton NS, et al. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110 (50): 20248–53. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1320524110>.
- Klasse PJ. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Advances in biology*. 2014; 2014 (1): 157895. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/157895>.
- Yamaizumi M, et al. Neutralization of diphtheria toxin in living cells by microinjection of antifragment A contained within resealed erythrocyte ghosts. *Cell*. 1978; 13 (2): 227–32. Available from: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90191-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90191-5).
- Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983; 302 (5909): 575–81. Available from: <https://doi.org/10.1038/302575a0>.
- Burke B, Warren G. Microinjection of mRNA coding for an anti-golgi antibody inhibits intracellular transport of a viral membrane protein. *Cell*. 1984; 36 (4): 847–56. Available from: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90034-5).
- Cottignies-Calamarte A, Tudor D, Bomsel M. Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Frontiers in immunology*. 2023; 14: 1037033. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1037033>.
- Tiller KE, Tessier PM. Advances in Antibody Design. *Annual review of biomedical engineering*. 2015; 17 (1): 191–216. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>.
- Helfrich W, et al. A rapid and versatile method for harnessing scFv antibody fragments with various biological effector functions.

- Journal of Immunological Methods. 2000; 237 (1–2): 131–45. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00220-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00220-3).
28. Ahmad ZA, et al. scFv antibody: Principles and clinical application. *Journal of Immunology Research*. 2012; 2012 (1): 980250. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/980250>.
 29. Le Gall F, et al. Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: Effect of valency on cell binding. *FEBS letters*. 1999; 453 (1–2): 164–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00713-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00713-9).
 30. Kabayama H, et al. An ultra-stable cytoplasmic antibody engineered for in vivo applications. *Nature communications*. 2020; 11 (1): 336. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13654-9>.
 31. Marschall ALJ, Dübel S, Böldicke T. Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies. *MAbs*. 2015; 7 (6): 1010–35. Available from: <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1076601>.
 32. Karikó K, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005; 23 (2): C. 165–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>.
 33. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2014; 13 (10): 759–80. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd4278>.
 34. Jin Q, et al. The protective effect of a combination of human intracellular and extracellular antibodies against the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022; 18 (1): 2035118. Available from: <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2035118>.
 35. Mukhtar MM, et al. Single-chain intracellular antibodies inhibit influenza virus replication by disrupting interaction of proteins involved in viral replication and transcription. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009; 41 (3): 554–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.07.001>.
 36. Ashour J, et al. Intracellular expression of camelid single-domain antibodies specific for influenza virus nucleoprotein uncovers distinct features of its nuclear localization. *Journal of virology*. 2015; 89 (5): 2792–800. Available from: <https://doi.org/10.1128/JVI.02693-14>.
 37. Blavier J, et al. Targeting viral replication complexes with mRNA-encoded nanobodies: a new frontier for antiviral design. *Drug Discovery Today*. 2025; 104531. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2025.104531>.

References

1. Bender RG, et al. Global, regional, and national incidence and mortality burden of non-COVID-19 lower respiratory infections and aetiologies, 1990–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Infectious Diseases*. 2024; 24 (9): 974–1002. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00176-2).
2. Lin JJ, Feramisco JR. Disruption of the in vivo distribution of the intermediate filaments in fibroblasts through the microinjection of a specific monoclonal antibody. *Cell*. 1981; 24 (1): 185–93. Available from: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90514-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90514-6).
3. Blose SH, Meltzer DI, Feramisco JR. 0-nm Filaments Are Induced to Collapse in Living Cells Microinjected with Monoclonal and Polyclonal Antibodies Against Tubulin. *Journal of Cell Biology*. 1984; 98: 847–58. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.98.3.847>.
4. Kallajoki M, et al. Microinjection of a monoclonal antibody against SPN antigen, now identified by peptide sequences as the NuMA protein, induces micronuclei in PtK2 cells. *Journal of Cell Science*. 1993; 104 (1): 139–50. Available from: <https://doi.org/10.1242/jcs.104.1.139>.
5. Rabbitts TH. Intracellular Antibodies for Drug Discovery and as Drugs of the Future. *Antibodies*. 2023; 12 (1). Available from: <https://doi.org/10.3390/antib12010024>.
6. Biocca S, Neuberger MS, Cattaneo A. Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *The EMBO Journal*. 1990; 9 (1): 101–8. Available from: <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08085.x>.
7. Marschall ALJ, Dübel S, Böldicke T. Recent advances with ER targeted intrabodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 917: 77–93. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8_5.
8. Gerondopoulos A, et al. A signal capture and proofreading mechanism for the KDEL-receptor explains selectivity and dynamic range in ER retrieval. *eLife*. 2021; 10. Available from: <https://doi.org/10.7554/eLife.68380>.
9. Johnson AE, Van Waes MA. The Translocon: A Dynamic Gateway at the ER Membrane. *Annual review of cell and developmental biology*. 1999; 15 (1): 799–842. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.799>.
10. Haryadi R, et al. Optimization of Heavy Chain and Light Chain Signal Peptides for High Level Expression of Therapeutic Antibodies in CHO Cells. *PLoS one*. 2015; 10 (2). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116878>.
11. Marschall ALJ, et al. Targeting antibodies to the cytoplasm. *mAbs*. 2011; 3 (1): 3–16. Available from: <https://doi.org/10.4161/mabs.3.1.14110>.
12. Richardson JH, Wayne MA. Intracellular antibodies: development and therapeutic potential. *Trends in biotechnology*. 1995; 13 (8): 306–10. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88970-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88970-2).
13. Плотникова М. А., и др. scFv-фрагменты рекомбинантных антител к вирусу гриппа: получение и характеристика функциональной активности. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. Принято к публикации 12.12.2025. Available from: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-728>.
14. Killian ML. Hemagglutination assay for influenza virus. *Animal influenza virus*. *Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology*. 2014; 1161: 3–9. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_1.
15. Plotnikova MA, et al. Antibody microarray immunoassay for screening and differential diagnosis of upper respiratory tract viral pathogens. *Journal of Immunological Methods*. 2020; 478: 112712. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112712>.
16. Corti D, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*. 2011; 333 (6044): 850–6. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1205669>.
17. Krivitskaya VZ, et al. Detection and Differentiation of Current Influenza B Viruses by the Microculture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2023; 59 (7): 1039–46. Available from: <https://doi.org/10.1134/S0003683823070037>.
18. Biswas M, et al. Broadly neutralizing antibodies for influenza: Passive immunotherapy and intranasal vaccination. *Vaccines*. 2020; 8 (3): 424. Available from: <https://doi.org/10.3390/vaccines8030424>.
19. Momont C, et al. A pan-influenza antibody inhibiting neuraminidase via receptor mimicry. *Nature*. 2023; 618 (7965): 590–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06136-y>.
20. Heaton NS, et al. Genome-wide mutagenesis of influenza virus reveals unique plasticity of the hemagglutinin and NS1 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013; 110 (50): 20248–53. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1320524110>.
21. Klasse PJ. Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Advances in biology*. 2014; 2014 (1): 157895. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/157895>.
22. Yamaizumi M, et al. Neutralization of diphtheria toxin in living cells by microinjection of antifragment A contained within resealed erythrocyte ghosts. *Cell*. 1978; 13 (2): 227–32. Available from: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90191-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90191-5).
23. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 1983; 302 (5909): 575–81. Available from: <https://doi.org/10.1038/302575a0>.
24. Burke B, Warren G. Microinjection of mRNA coding for an anti-golgi antibody inhibits intracellular transport of a viral membrane protein. *Cell*. 1984; 36 (4): 847–56. Available from: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90034-5).
25. Cottignies-Calamarte A, Tudor D, Bomsel M. Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Frontiers in immunology*. 2023; 14: 1037033. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1037033>.
26. Tiller KE, Tessier PM. *Advances in Antibody Design*. Annual review

- of biomedical engineering. 2015; 17 (1): 191–216. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>.
27. Helfrich W, et al. A rapid and versatile method for harnessing scFv antibody fragments with various biological effector functions. *Journal of Immunological Methods*. 2000; 237 (1–2): 131–45. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00220-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00220-3).
 28. Ahmad ZA, et al. scFv antibody: Principles and clinical application. *Journal of Immunology Research*. 2012; 2012 (1): 980250. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/980250>.
 29. Le Gall F, et al. Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: Effect of valency on cell binding. *FEBS letters*. 1999; 453 (1–2): 164–8. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00713-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00713-9).
 30. Kabayama H, et al. An ultra-stable cytoplasmic antibody engineered for in vivo applications. *Nature communications*. 2020; 11 (1): 336. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13654-9>.
 31. Marschall ALJ, Dübel S, Böldicke T. Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies. *MAbs*. 2015; 7 (6): 1010–35. Available from: <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1076601>.
 32. Karikó K, et al. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005; 23 (2): C. 165–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>.
 33. Sahin U, Karikó K, Türeci Ö. mRNA-based therapeutics-developing a new class of drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2014; 13 (10): 759–80. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrd4278>.
 34. Jin Q, et al. The protective effect of a combination of human intracellular and extracellular antibodies against the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2022; 18 (1): 2035118. Available from: <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2035118>.
 35. Mukhtar MM, et al. Single-chain intracellular antibodies inhibit influenza virus replication by disrupting interaction of proteins involved in viral replication and transcription. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009; 41 (3): 554–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.07.001>.
 36. Ashour J, et al. Intracellular expression of camelid single-domain antibodies specific for influenza virus nucleoprotein uncovers distinct features of its nuclear localization. *Journal of virology*. 2015; 89 (5): 2792–800. Available from: <https://doi.org/10.1128/JVI.02693-14>.
 37. Blavier J, et al. Targeting viral replication complexes with mRNA-encoded nanobodies: a new frontier for antiviral design. *Drug Discovery Today*. 2025; 104531. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2025.104531>.

HMGB1 И ANTI-HMGB1 АНТИТЕЛА ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ И ДРУГИХ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

М. М. Меламуд¹, Е. А. Ермаков^{1,2}, А. С. Толмачева¹, А. Э. Сизиков^{1,3}, Н. А. Кляус⁴, Г. А. Невинский¹, В. Н. Бунева^{1,2}✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

Белок В1 группы высокой подвижности (англ. high-mobility group protein B1, HMGB1) относится к аларминам — группе молекул, участвующих в воспалительных реакциях. HMGB1 активно изучают в контексте некоторых ревматических заболеваний (РЗ), включая системную красную волчанку (СКВ), ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилит (АС) и псориатический артрит (ПсА), однако накопленных знаний недостаточно. HMGB1 может также выступать антигеном, но уровень anti-HMGB1 антител плохо изучен при РЗ. Целью работы было изучить концентрации HMGB1 и anti-HMGB1 антител при четырех РЗ. Методом иммуноферментного анализа проанализированы образцы плазмы пациентов с РА ($n = 60$), АС ($n = 60$), СКВ ($n = 24$), ПсА ($n = 30$) и здоровых доноров (ЗД) ($n = 60$). После поправки на возраст и длительность заболевания показано, что концентрация HMGB1 достоверно повышалась при СКВ ($p < 0,01$), РА ($p < 0,01$) и АС ($p = 0,017$), а при ПсА выявлено статистически незначимое повышение HMGB1 ($p = 0,07$) по сравнению с ЗД. Среди четырех заболеваний наибольший уровень HMGB1 выявлен при СКВ ($p < 0,01$). Концентрация anti-HMGB1 антител оказалась также выше при СКВ ($p < 0,01$), РА ($p = 0,026$) и АС ($p = 0,028$). Методами корреляционного и регрессионного анализа установлена выраженная прямая ассоциация между уровнем HMGB1 и индексом DAS28 при РА ($p < 0,01$ для обоих анализов). Результаты работы описывают характерные изменения уровня HMGB1 и anti-HMGB1 антител при РЗ и указывают на вовлеченность HMGB1 в патогенез этих заболеваний.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, системная красная волчанка, HMGB1, anti-HMGB1 антитела

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00357).

Вклад авторов: М. М. Меламуд — обработка результатов, написание статьи; Е. А. Ермаков — планирование исследования, написание и редактирование статьи; А. С. Толмачёва — экспериментальная работа, анализ данных; А. Э. Сизиков, Н. А. Кляус — сбор и подготовка материала, анализ данных; Г. А. Невинский, В. Н. Бунева — курирование работы, редактирование; вклад М. М. Меламуда и Е. А. Ермакова был равнозначным.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (протокол № 3 от 19 июня 2023 г.), проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации; все участники исследования подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Валентина Николаевна Бунева
пр. Академика Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090, Россия; buneva@1bio.ru

Статья получена: 29.10.2025 **Статья принята к печати:** 06.12.2025 **Опубликована онлайн:** 14.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.074

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/>).

HMGB1 AND ANTI-HMGB1 ANTIBODIES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND OTHER RHEUMATIC DISEASES

Melamud MM¹, Ermakov EA^{1,2}, Tolmacheva AS¹, Sizikov AE^{1,3}, Klyaus NA⁴, Nevinsky GA¹, Buneva VN^{1,2}✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

The high-mobility group protein B1 (HMGB1) belongs to alarmins — a group of molecules involved in inflammatory responses. HMGB1 is actively studied in the context of certain rheumatic diseases (RDs), including systemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS), and psoriatic arthritis (PsA), but the accumulated knowledge remains insufficient. HMGB1 can also act as an antigen, yet the level of anti-HMGB1 antibodies is poorly understood in RDs. The aim of this study was to investigate the concentrations of HMGB1 and anti-HMGB1 antibodies in four RDs. Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), plasma samples from patients with RA ($n = 60$), AS ($n = 60$), SLE ($n = 24$), PsA ($n = 30$), and healthy donors (HD) ($n = 60$) were analyzed. After adjustment for age and disease duration, it was shown that the concentration of HMGB1 was significantly increased in SLE ($p < 0.01$), RA ($p < 0.01$), and AS ($p = 0.017$), while a statistically non-significant increase in HMGB1 was observed in PsA ($p = 0.07$) compared to HD. Among the four diseases, the highest level of HMGB1 was found in SLE ($p < 0.01$). The concentration of anti-HMGB1 antibodies was also elevated in SLE ($p < 0.01$), RA ($p = 0.026$), and AS ($p = 0.028$). Using correlation and regression analysis, a strong direct association was established between the level of HMGB1 and the DAS28 index in RA ($p < 0.01$ for both analyses). The results of the study describe characteristic changes in HMGB1 and anti-HMGB1 antibody levels in RDs and indicate the involvement of HMGB1 in the pathogenesis of these diseases.

Keywords: rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, systemic lupus erythematosus, HMGB1, anti-HMGB1 antibodies

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 23-15-00357).

Author contribution: Melamud MM — data analysis, manuscript writing; Ermakov EA — study design, manuscript writing and editing; Tolmacheva AS — experimental work, data analysis; Sizikov AE, Klyaus NA — material collection and preparation, data analysis; Nevinsky GA, Buneva VN — project supervision, editing. The contributions of Melamud MM and Ermakov EA were equal.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Protocol No. 3 dated June 19, 2023) and was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All study participants provided written informed consent.

✉ **Correspondence should be addressed:** Valentina N. Buneva
prospekt Akademika Lavrentieva, 8, Novosibirsk, 630090, Russia; buneva@1bio.ru

Received: 29.10.2025 **Accepted:** 06.12.2025 **Published online:** 14.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.074

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/>).

Ревматические заболевания (РЗ) являются важной медико-социальной проблемой, что связано с их распространенностью, влиянием на качество жизни и высокими экономическими затратами на лечение. Системная красная волчанка (СКВ) — одно из распространенных РЗ, поражающее в основном женщин молодого возраста (15–45 лет), что сказывается не только на качестве их жизни, но и косвенно на демографической ситуации. Мировая распространенность СКВ варьирует от 3 до 517 случаев на 100 тыс. человек, а в последние десятилетия наблюдается рост заболеваемости [1]. Другим распространенным РЗ является ревматоидный артрит (РА): примерно 200 случаев на 100 тыс. населения, причем заболеваемость неуклонно растет и по прогнозам может увеличиться почти в два раза к 2050 г. [2]. Анкилозирующий спондилит (АС), или болезнь Бехтерева, диагностируют у 9–30 человек на 100 тыс. населения [3]. В отличие от большинства РЗ, АС чаще поражает мужчин, чем женщин (~2–3:1), и чаще мужчин трудоспособного возраста, так как 92% пациентов испытывают первые симптомы заболевания до 45 лет [4]. Псориазическому артриту (ПсА) посвящено намного меньше исследований по сравнению с другими РЗ, хотя это заболевание достаточно распространено (более 100 случаев на 100 тыс. населения) и негативно влияет на качество жизни пациентов [5]. Лечение РЗ с каждым годом все больше увеличивает финансовую нагрузку на систему здравоохранения [6]. Высокая распространенность и социальная значимость РЗ диктуют необходимость поиска новых биомаркеров для ранней диагностики и своевременного лечения. Кроме того, сравнение биомаркеров среди РЗ может выявить характерные патофизиологические механизмы каждого РЗ и потенциальные маркеры для дифференциальной диагностики.

Патогенез РЗ связан с активацией воспалительных путей как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями (damage-associated molecular patterns, DAMP), или алармины, вносят большой вклад в формирование воспалительных реакций [7]. Алармины ядерного происхождения играют большую роль в патогенезе РЗ [8–10]. Один из белков ядерного происхождения, который может быть связан с патогенезом РЗ, — белок В1 группы высокой подвижности (англ. high-mobility group protein B1, HMGB1). HMGB1 состоит из бокса А, который считается противовоспалительным, бокса В, проявляющего провоспалительные функции, и кислого хвоста, ограничивающего активность этого белка внутри ядра [11]. HMGB1 действует как хемоаттрактант, привлекая иммунные клетки в очаг поражения. В комплексе с ДНК он действует синергично, запуская мощный провоспалительный ответ, имеющий ключевое значение для аутоиммунитета, в том числе при РЗ [12]. Несмотря на то что изменение концентраций этого белка при СКВ и РА изучено достаточно хорошо [12, 13], для АС и ПсА в литературе присутствует довольно мало сведений. Кроме того, в мировой литературе наблюдается недостаточное количество исследований ассоциации уровня этого белка с клиническими проявлениями заболеваний и сравнения этих показателей между различными РЗ.

В патогенезе РЗ участвует не только врожденный, но и адаптивный иммунитет. Аутоантитела, в особенности антинуклеарные антитела, считаются биомаркерами СКВ. У пациентов с РА часто обнаруживаются антитела к циклическому цитруллинированному полипептиду (АЦЦП) и ревматоидный фактор (РФ). Некоторые из таких

аутоантител входят в критерии для постановки диагноза [14, 15]. Известно, что на HMGB1 также вырабатываются антитела, которые могут участвовать в патогенетических процессах при РЗ [16, 17]. Однако исследований анти-HMGB1-антител при РЗ крайне мало, несмотря на то что такие антитела представляют большой интерес, так как HMGB1 активно участвует в воспалительном ответе и развитии аутоиммунных реакций.

Цель данной работы — провести анализ концентраций HMGB1 и анти-HMGB1 антител в крови пациентов с СКВ, РА, ПсА, АС и здоровых доноров, а также связи уровня этих маркеров с клиническими характеристиками заболеваний.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты и здоровые доноры

Исследование проводили в период с июля 2023 по июль 2025 г. на базе двух организаций: Институт химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН, Новосибирск; НИИ фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ) СО РАН, Новосибирск, Россия.

В исследование были включены: 60 пациентов с диагнозом РА, установленным в соответствии с критериями Американского колледжа ревматологов/Европейской антиревматической лиги (ACR/EULAR) 2010 г.; 60 пациентов с диагнозом АС (а также с диагнозом аксиальный спондилоартрит), установленным в соответствии с Нью-Йоркскими критериями и критериями Международного общества по оценке спондилоартрита (ASAS); 30 пациентов с диагнозом ПсА, установленным в соответствии с критериями CASPAR (критерии классификации псориазического артрита); 24 пациента с диагнозом СКВ, установленным в соответствии с диагностическими критериями Европейской антиревматической лиги (EULAR) и Американской коллегии ревматологов (ACR) 2019 г.; 60 здоровых лиц без активной соматической патологии. Постановку диагноза и сбор анамнеза проводили квалифицированными врачами ревматологами на базе НИИФКИ, там же проводили сбор крови пациентов. Сбор крови здоровых доноров проводили на базе ИХБФМ СО РАН. Клиническое состояние пациентов с РА оценивали по индексу DAS28, АС — по индексам ASDAS-CRP/ASDAS-ESR и BASDAI, ПсА — по индексу DAPSA, СКВ — по индексу SELENA-SLEDAI.

Для участия в исследовании пациенты должны были соответствовать следующим критериям включения: наличие подписанного добровольного информированного согласия; возраст от 18 лет; установленный диагноз РА, ПсА, СКВ или АС. Критерии исключения: наличие других аутоиммунных заболеваний; онкологические заболевания в анамнезе; тяжелые поражения печени и почек; острые воспалительные заболевания за две недели до взятия образцов крови; перенесенные хирургические операции в течение последних двух месяцев; ВИЧ-инфекция и беременность. Здоровые доноры должны были подписать информированное согласие, быть старше 18 лет, а также не подходить ни под один из критериев исключения.

Кровь собирали в вакуумные пробирки с КЗЭДТА (VACUETTE, Greiner Bio-One GmbH, Австрия). Плазму крови получали путем центрифугирования в течение 30 мин при 2000 — г при 4 °С, аликвотировали и хранили при –20 °С до проведения анализа.

Таблица 1. Клинико-anamнестические данные пациентов с ревматическими заболеваниями и здоровых лиц

Параметр*	РА (n = 60) (1)	АС (n = 60) (2)	ПсА (n = 30) (3)	СКВ (n = 24) (4)	Здоровые (n = 60) (5)	p**
Пол (м/ж), %	22/78	69/31	30/70	0/100	30/70	< 0,01
Возраст, лет	52 (38; 61)	46 (38; 52)	44 (34; 56)	44 (31; 54)	45 (29; 51)	Н.З.
Длительность заболевания, лет	9 (5; 17,5)	12 (7,8; 22,3)	12,5 (3; 21,3)	6 (3; 14)	–	2 vs. 4: < 0,01
ИМТ	26 (23; 29)	25,8 (21,5; 28,1)	25,9 (21,2; 30)	25,2 (21; 28)	23,5 (20,2; 26,3)	Н.З.
СОЭ, мм/ч	2,6 (0,8; 11,5)	2,8 (1,1; 6,2)	4,3 (2,4; 9,8)	2,2 (0,8; 8,9)	–	Н.З.
СРБ, мг/л	14,5 (6,8; 28)	10 (4; 18)	16 (10; 26)	15 (8,5; 38)	–	Н.З.
Клинический индекс	DAS28: 3,4 (2,6; 4,6)	ASDAS-CRP: 1,7 (1,3; 2,5); ASDAS-ESR: 1,8 (1,31; 2,6); BASDAI: 1,9 (1,0; 3,2)	DAS28: 3,5 (1; 9,4); DAPSA: 14 (6; 22)	SELENA-SLEDAI: 4 (2; 8)	–	–

Примечание: * — данные представлены как Ме (Q₁; Q₃). ** — тест Хи-квадрат с поправкой Йейтса или тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна. ИМТ — индекс массы тела, СОЭ — скорость оседания эритроцитов, СРБ — С-реактивный белок, Н.З. — не значимо.

Определение концентрации HMGB1 и анти-HMGB1-антител

Концентрацию HMGB1 определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора Human HMGB1 ELISA Kit (Кат. №: E-EL-H1554, Elabscience, США). Чувствительность данного набора составила 18,75 пг/мл, диапазон измерений — 31,25–2000 пг/мл. Плазму крови для анализа предварительно разводили в 10 раз. Концентрацию анти-HMGB1-антител определяли с помощью набора ELISA Kit for anti-HMGB1 antibody (Кат. №: AEA399Hu, Cloud-Clone Corp., Китай). Чувствительность данного набора составила 1,17 нг/мл, диапазон измерений — 3,12–200 нг/мл. Участников с концентрацией ниже порога чувствительности считали не имеющими анти-HMGB1-антител. Плазму крови для анализа анти-HMGB1-антител предварительно разводили в 100 раз. Оптическую плотность измеряли на приборе Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific Inc., США) при длине волны 450 нм согласно инструкциям производителей наборов.

Статистический анализ

Статистический анализ и визуализацию полученных данных проводили в OriginPro 2021, а также в среде для обработки кода Google Colab с использованием библиотек NumPy 2.3.3, SciPy 1.16.2 и Matplotlib 3.10.6 на языке программирования Python 3.13.0. Определение типа распределения данных в отдельных выборках оценивали с помощью теста Шапиро–Уилка. Поскольку данные в основном не соответствовали нормальному закону распределения, результаты представлены в виде медианы (Q₁–Q₃). Сравнение значений между выборками с учетом ковариат (возраста и длительности заболевания) проводили с помощью рангового ANCOVA с последующим апостериорным тестом Данна. Категориальные переменные (частота встречаемости признака) оценивали с помощью критерия хи-квадрат. Разницу в частоте встречаемости признака оценивали с помощью расчета отношения шансов (odds ratio, OR). Корреляции оценивали с помощью критерия Спирмена. Для оценки связи между зависимой переменной (DAS28) и предикторами использовали множественную линейную регрессию. Перед проведением множественной регрессии все данные нормированы путем логарифмирования (log10).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика выборки

Всего в исследовании принимало участие 234 человека: 60 пациентов с РА, 60 — с АС, 30 — с ПсА, 24 — с СКВ и 60 здоровых лиц. Клинико-anamнестические данные участников представлены в табл. 1. Большинство пациентов с РА имели умеренную активность заболевания по индексу DAS28. Среди пациентов с РА 80% были положительными по РФ. АЦЦП обнаружили у 82% пациентов с РА. Пациенты с АС в основном имели низкую активность заболевания по индексам ASDAS-CRP/ASDAS-ESR и умеренную активность по индексу BASDAI. Среди пациентов с АС 76% несли аллель 27 локуса В гена человеческого лейкоцитарного антигена (HLA-B27). Большинство пациентов с ПсА имели умеренную активность заболевания по индексам DAS28 и DAPSA. Среди пациентов с СКВ более половины имели низкую активность заболевания. Участники отличались по соотношению мужчин и женщин, а у пациентов с РА проявлялась тенденция к большему возрасту, чем в других группах, что связано с половозрастными особенностями заболеваний. Кроме того, пациенты с АС имели большую длительность заболевания, чем пациенты с СКВ (табл. 1).

Все пациенты проходили терапию. В частности, 56% пациентов с РА, 90% с АС и 50% с ПсА принимали генно-инженерные биологические препараты (ГИБП). Пациенты с СКВ не принимали ГИБП. Среди других препаратов 43% пациентов с РА, 32% с АС, 40% с ПсА и 8% с СКВ пациентов принимали метотрексат. При СКВ наиболее распространенным препаратом был гидроксихлорохин (71%).

Концентрации HMGB1 и анти-HMGB1-антител

Для учета тенденции к большему возрасту пациентов с РА и значимых различий в длительности заболеваний анализ концентрации HMGB1 и анти-HMGB1 антител проведен методом ранговой ANCOVA с апостериорным тестом Данна с учетом двух ковариат: возраст и длительность заболевания. Для здоровых лиц учитывали только ковариату возраста. Анализ показал, что после поправки на возраст и длительность заболевания концентрация HMGB1 в плазме пациентов с СКВ (Ме [Q₁–Q₃]: 22,6 [12,8–33,5] нг/мл), РА (14,9 [9–23]) и АС (12,5 [7,6–18,9]) оказалась достоверно выше, чем у здоровых лиц (8,6 [5,7–12,2]) (рис. 1А). Уровень HMGB1 при ПсА (11,6 [5,9–20,1]) значимо

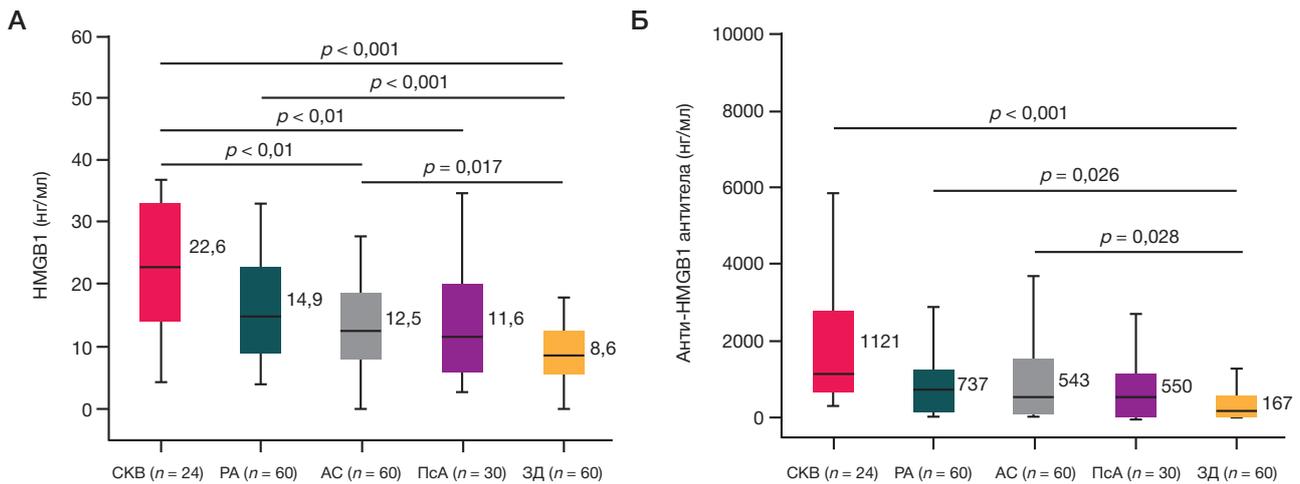


Рис. 1. Концентрация HMGB1 (А) и анти-HMGB1 антител (Б) в плазме пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), ревматоидным артритом (РА), анкилозирующим спондилитом (АС), псориатическим артритом (ПсА) и здоровых доноров (ЗД). Анализ выполнен методом ранговой ANCOVA с апостериорным тестом Данна с учетом следующих ковариат: длительность заболевания, возраст. Справа от боксов представлены медианные значения

не отличался от уровня у здоровых доноров. Концентрация HMGB1 при СКВ оказалась выше, чем у пациентов с АС и ПсА. Стоит отметить, что возраст и длительность заболевания значимо не влияли на показатели в модели ANCOVA. Таким образом, наиболее высокий уровень HMGB1 обнаружен у пациентов с СКВ.

Уровни HMGB1 в подгруппах пациентов в зависимости от клинических особенностей практически не различались. В частности, концентрации HMGB1 у РФ-положительных РА-пациентов (17,5 [9–25,2]) и РФ-отрицательных (13,6 [6,1–23,4]) значимо не различались ($p = 0,33$). У АЦЦП-положительных (17,5 [9–25,4]) и АЦЦП-отрицательных РА-пациентов (9,7 [6,9–22,1]) уровень HMGB1 также не отличался ($p = 0,26$). При АС выявлен статистически незначимый тренд на увеличение уровня HMGB1 у HLA-B27-положительных пациентов (12,8 [9,6–18,9]) по сравнению с HLA-B27-негативными (9 [6,2–13,7]) ($p = 0,07$).

Анализ концентрации анти-HMGB1-антител с поправкой на возраст и длительность заболевания показал значимое увеличение уровня антител при СКВ (Me [Q_1 – Q_3]: 1121 [691–2859] нг/мл), РА (737 [104–1219]) и АС (543 [55–1546]) по сравнению со здоровыми лицами (167 [0–602]) (рис. 1Б). Уровень антител при ПсА (550 [0–1158]) не отличался от такового в контрольной группе. Наибольший медианный уровень анти-HMGB1-антител обнаружен у пациентов с СКВ, однако значимых различий при четырех заболеваниях не выявлено. Возраст и длительность заболевания не оказались значимыми ковариатами в модели ANCOVA.

Уровень анти-HMGB1-антител варьировал среди участников. Исходя из чувствительности набора (1,17 нг/мл), участников разделили на анти-HMGB1-негативных (ниже порога) и анти-HMGB1-положительных (выше порога) (рис. 2). Относительная частота анти-HMGB1-положительных участников оказалась самой низкой у здоровых лиц и увеличивалась среди пациентов с РЗ в следующем порядке: СКВ, РА, АС и ПсА. Анти-HMGB1-антитела выявлялись при СКВ в 40,2 раза чаще (95%CI: 2,3–692, $p = 0,0003$), чем у здоровых лиц. При РА и АС такие антитела также выявлялись в 2,7 (1,23–5,9, $p = 0,02$) и 2,45 (1,13–5,33, $p = 0,04$) раз чаще, соответственно, чем в контрольной группе. Анти-HMGB1-антитела обнаруживали у пациентов с СКВ в 15,3 (0,87–267, $p = 0,04$) раз чаще, чем при РА, в 16,6 (0,96–291, $p = 0,03$) раз чаще, чем при АС, и в 25,1 (1,38–455, $p = 0,008$) раз чаще, чем при ПсА. Эти данные указывают на большую частоту встречаемости анти-

HMGB1-антител при СКВ, чем при других ревматических заболеваниях.

При анализе в клинических подгруппах не выявлены значимые различия. В частности, уровни анти-HMGB1-антител у РФ-положительных РА пациентов (784 [23–1219]) и у с РФ-отрицательных (717 [502–1051]) не различались ($p = 0,69$). Концентрации анти-HMGB1 антител у АЦЦП-положительных (679 [32–1117]) и АЦЦП-отрицательных РА пациентов (1117 [542–1431]) также не различались ($p = 0,12$). При АС уровни анти-HMGB1-антител у HLA-B27-положительных (584 [32–1388]) и HLA-B27-отрицательных (369 [13–1383]) пациентов также не различались ($p = 0,62$).

Корреляции

В результате корреляционного анализа выявлена прямая корреляция уровня HMGB1 с СРБ и СОЭ при РА, АС и ПсА (рис. 3). Антитела к HMGB1 положительно коррелировали только с СРБ у пациентов с РА и с СОЭ у пациентов с АС. Неожиданно оказалось, что у пациентов с СКВ ни HMGB1, ни анти-HMGB1 не коррелировали с СОЭ и СРБ (рис. 3А), что, возможно, связано с малым размером выборки. Эти данные подчеркивают провоспалительную роль HMGB1 при РА, АС и ПсА.

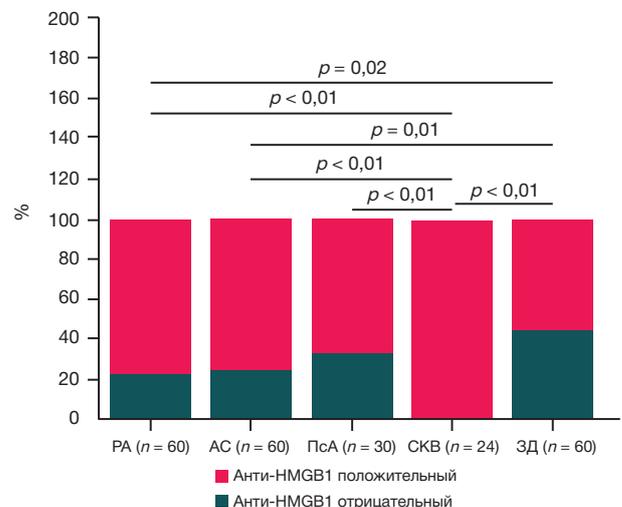


Рис. 2. Частота встречаемости анти-HMGB1 антител у пациентов с РА, АС, ПсА, СКВ и здоровых доноров (ЗД). Статистическая значимость оценена с помощью критерия Хи-квадрат

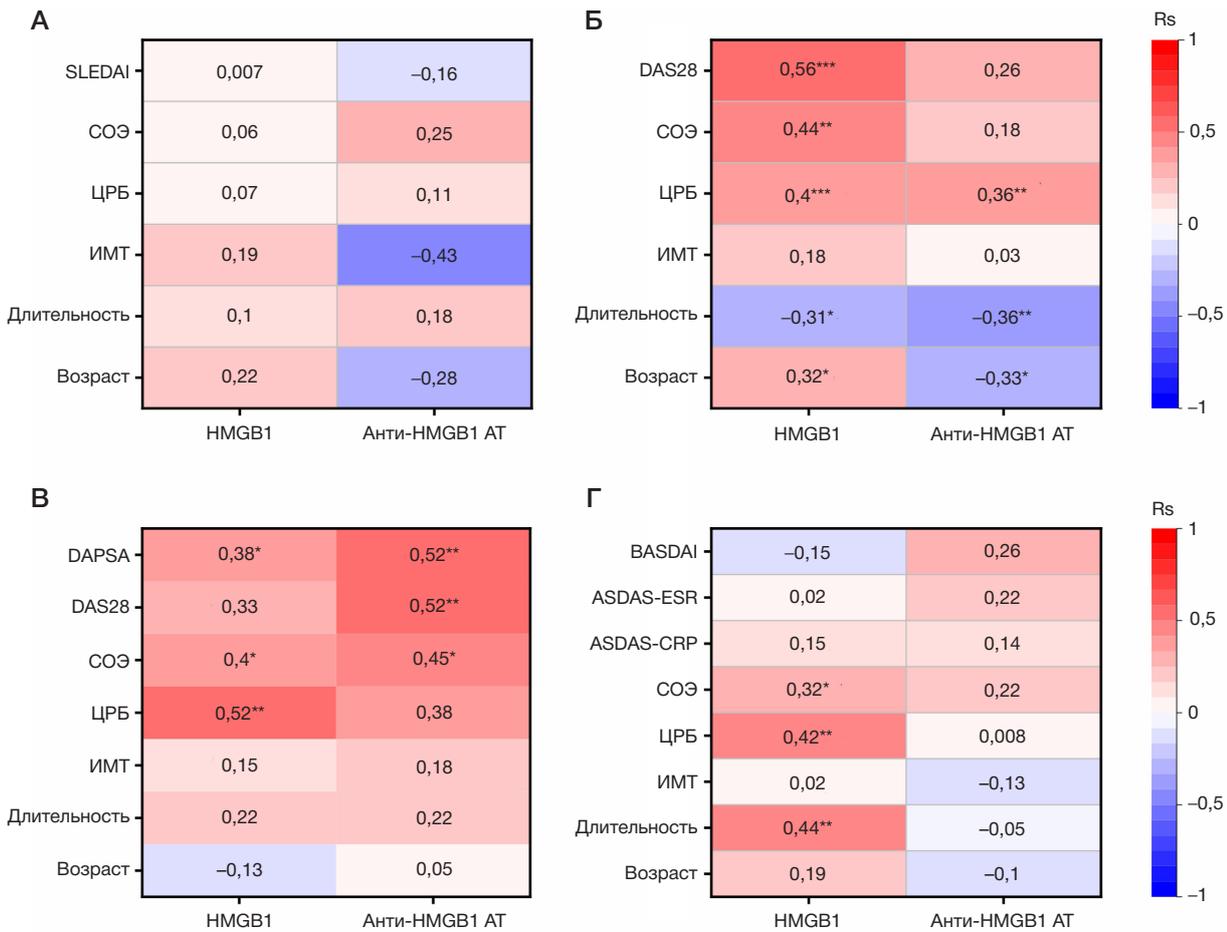


Рис. 3. Корреляция концентрации HMGB1 и анти-HMGB1 антител с клиническими показателями пациентов с СКВ (А), РА (Б), ПсА (В) и АС (Г). Цветом закодированы коэффициенты корреляции Спирмена (Rs). * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$

Анализ корреляции HMGB1 с индексом DAS28 у пациентов с РА показал выраженную положительную ассоциацию ($R_s = 0,56, p = 8,4e-6$) (рис. 3Б). У пациентов с ПсА уровень HMGB1 положительно коррелировал с индексом DAPSA ($R_s = 0,38, p = 0,04$), но не с индексом DAS28 (рис. 3В). Уровень антител к HMGB1 положительно коррелировал как с индексом DAS28 ($R_s = 0,52, p = 0,005$), так и с индексом DAPSA ($R_s = 0,52, p = 0,005$) при ПсА. У пациентов с АС и СКВ не было установлено статистически значимых корреляций с исследуемыми маркерами и клиническими индексами (рис. 3).

Регрессионный анализ

Для оценки связи между концентрацией HMGB1, анти-HMGB1-антител, как независимых предикторов, с клиническими индексами (DAS28 — для РА; ASDAS-CRP, ASDAS-ESR, BASDAI — для АС; DAS28, DAPSA — для ПсА и SELENA-SLEDAI — для СКВ), как зависимыми переменными, проведен множественный регрессионный анализ. Из семи построенных регрессионных моделей только модель для РА оказалась значимой (табл. 2). Данная модель объясняет 31,1% вариации логарифмированного

показателя DAS28. Показано, что увеличение концентрации HMGB1 на 1% связано с увеличением DAS28 на 0,49% ($p < 0,001$). Для анти-HMGB1-антител статистически значимая ассоциация не установлена ($p = 0,145$) (табл. 2).

Поскольку СОЭ является одним из показателей для расчета индекса DAS28, была также построена регрессионная модель, в которой в качестве предикторов DAS28 использовали СОЭ и ЦРБ. Модель оказалась значимой ($R^2_{\text{корр.}} = 0,351; F = 15,31; p < 0,001$). Как ожидалось, $CO_{\text{Э}}$, в отличие от ЦРБ, оказался значимым предиктором DAS28. Показано, что при увеличении СОЭ на 1% в логарифмической шкале, DAS28 увеличился на 0,265%. Таким образом, HMGB1, наряду с СОЭ оказался предиктором DAS28.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущих исследованиях показано увеличение концентрации HMGB1 в крови при РА [18], АС [19], ПсА [20] и СКВ [21, 22] по сравнению со здоровыми лицами. Результаты данного исследования об увеличении уровня HMGB1 при СКВ, РА и АС (рис. 1А) согласуются с литературными [18–20]. Однако в данной работе выявлен

Таблица 2. Множественный регрессионный анализ для DAS28 как зависимой переменной, а HMGB1 и анти-HMGB1 антителами в качестве предикторов

Переменная	β	Ст. ошибка	t	p	Модель
Константа	-1,6808	0,468	-3,588	$< 0,001$	$R^2_{\text{корр.}} = 0,311;$ $F = 11,13;$ $p < 0,001$
HMGB1	0,4878	0,108	4,51	$< 0,001$	
Анти-HMGB1 антитела	0,0646	0,043	1,495	0,145	

только тренд на увеличение в 1,39 раза HMGB1 при ПсА, что может быть связано с малым размером выборки и эффектом от лечения. Поэтому необходимы дальнейшие исследования уровня HMGB1 и его роли при ПсА.

Предыдущие исследования были сфокусированы на анализе уровня HMGB1 при определенном РЗ [18–21]. В данной работе проведен сравнительный анализ при четырех РЗ. В результате наибольший уровень HMGB1 выявлен при СКВ (рис. 1А). Эти данные могут отражать наиболее выраженное провоспалительное состояние при СКВ по сравнению с другими РЗ, поскольку HMGB1 является воспалительным медиатором [12]. Тем не менее, учитывая выявленное повышение уровня HMGB1 и ассоциацию с DAS28 (рис. 1А, рис. 3Б, табл. 2), можно предположить, что HMGB1 тоже вовлечен в патогенез РА. Поэтому существующие терапевтические стратегии против HMGB1, включая моноклональные антитела [12], могут оказаться эффективными для лечения пациентов с СКВ и РА, однако необходимы исследования эффектов подавления HMGB1 при данных патологиях.

Выявленная ассоциация уровня HMGB1 с DAS28 при РА по результатам регрессионного (табл. 2) и корреляционного (рис. 3Б) анализов оказалась интригующей. Показано, что увеличение концентрации HMGB1 на 1% связано с 0,49% увеличением DAS28 (табл. 2). При этом в регрессионной модели с использованием СОЭ как предиктора DAS28 выявлено, что увеличение СОЭ на 1% ассоциировано с 0,265% увеличением DAS28. Таким образом, уровень HMGB1 оказался сопоставимым предиктором DAS28 при РА, как и СОЭ, который используется для расчета этого индекса. Поэтому HMGB1 может быть рассмотрен как потенциальный маркер для оценки активности РА. Однако HMGB1 является неспецифическим маркером воспаления, что снижает его диагностическую и предикторную ценность в контексте РА.

Обнаруженная положительная корреляция HMGB1 с СОЭ и СРБ при РА, АС и ПсА (рис. 3) подчеркивает провоспалительную роль этого белка при перечисленных заболеваниях. Эти данные согласуются с литературными. Например, была показана корреляция HMGB1 с СОЭ и СРБ при АС [19]. В нашей работе такой ассоциации не выявлено при СКВ, хотя она была показана ранее [22]. Данный результат может быть связан с малым размером выборки или эффектами противовоспалительной терапии при СКВ.

Появление HMGB1 в кровотоке может быть связано как с активной секрецией, так и с гибелью клеток [11]. При различных вариантах гибели клеток HMGB1 может выделяться с другими ядерными компонентами, включая ДНК [11]. Существуют данные о повышении циркулирующей внеклеточной ДНК при СКВ [9, 23], РА [24] и АС [25, 26]. Они согласуются с полученными в нашем исследовании

результатами о повышении HMGB1 при СКВ, РА и АС (рис. 1А), поскольку циркулирующая внеклеточная ДНК может совыделяться в комплексе с HMGB1. Дальнейшие исследования могут быть направлены на изучение механизмов выделения HMGB1 при РЗ.

Повышенный уровень HMGB1 может быть связан с образованием антител к HMGB1 [16]. В данном исследовании повышенный уровень анти-HMGB1-антител выявлен при СКВ, РА и АС (рис. 1Б). Такие антитела чаще всего встречались у пациентов с СКВ (рис. 2), при которой также выявлен наиболее высокий уровень HMGB1 (рис. 1А). Интересно, что при ПсА уровень антител не отличался от контроля, что согласуется с низким уровнем HMGB1 у этих пациентов. Однако у таких пациентов неожиданно выявлена положительная корреляция анти-HMGB1-антител с DAS28 и DAPSA (рис. 3В), что требует дальнейшего изучения. Результат о повышении анти-HMGB1 антител при СКВ согласуется с литературными данными [16]. Однако информация о подобных антителах при РА, АС и ПсА в литературе отсутствует, поэтому данное исследование заполняет этот пробел.

К ограничениям данной работы стоит отнести относительно малый размер выборки, тренд на более высокий возраст РА пациентов, различия в длительности заболевания и несбалансированность выборки по половому соотношению, что обусловлено особенностями анализируемых РЗ. Однако в работе применяли поправку на возраст и длительность заболевания. В дальнейших исследованиях нужно выяснить влияние пола на изучаемые показатели.

ВЫВОДЫ

В данном исследовании выявлено увеличение концентрации HMGB1 в плазме при СКВ, РА и АС, в то время как при ПсА наблюдался только тренд на увеличение по сравнению со здоровыми донорами. Среди четырех ревматических заболеваний наибольшее увеличение HMGB1 выявлено у пациентов с СКВ. Уровень анти-HMGB1 антител также значительно повышался у пациентов с СКВ и в меньшей степени при РА и АС. Однако выраженных ассоциаций с клиническими параметрами СКВ не выявлено. Напротив, при РА уровень данных маркеров ассоциировался с клиническими данными пациентов, что было подтверждено как результатами корреляционного анализа, так и с помощью регрессионной модели. Эти данные указывают на то, что HMGB1 может быть вовлечен в сложные патогенетические механизмы преимущественно при РА и что подтверждает актуальность этой молекулы в качестве терапевтической цели. Анти-HMGB1-антитела ассоциировались с клиническими индексами у пациентов с ПсА, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения вклада данных антител в патогенез ПсА.

Литература

1. Carter EE, Barr SG, Clarke AE. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12: 605–20. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.137>.
2. Black RJ, Cross M, Haile LM, Culbreth GT, Steinmetz JD, Hagins H, et al. Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*. 2023; 5: e594–610. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(23\)00211-4](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00211-4).
3. Wang R, Ward MM. Epidemiology of axial spondyloarthritis: an update. *Current Opinion in Rheumatology*. 2018; 30: 137–43. Available from: <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000475>.
4. Boel A, López-Medina C, Van Der Heijde DMFM, Van Gaalen FA. Age at onset in axial spondyloarthritis around the world: data from the Assessment in SpondyloArthritis international Society Peripheral Involvement in Spondyloarthritis study. *Rheumatology*.

- 2022; 61: 1468–75. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab544>.
5. Lembke S, Macfarlane GJ, Jones GT. The worldwide prevalence of psoriatic arthritis — a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology*. 2024; 63: 3211–20. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keae198>.
 6. Лила А. М., Лила В. А. Социальная значимость и экономические последствия ревматических заболеваний. *Гигиена и санитария*. 2017; 96: 387–92. Available from: <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2017-96-4-387-392>.
 7. Danieli MG, Antonelli E, Piga MA, Claudi I, Palmeri D, Tonacci A, et al. Alarmins in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2022; 21: 103142. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103142>.
 8. Ermakov EA, Tolmacheva AS, Kon'kov VV, Melamud MM, Sizikov AE, Klyaus NA, et al. Plasma high-mobility group nucleosome-binding domain 1 (HMGN1) protein levels in four common rheumatic diseases: A potential biomarker of rheumatoid arthritis. *The Egyptian Rheumatologist*. 2025; 47: 51–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2024.12.003>.
 9. Truszcwska A, Wirkowska A, Gala K, Truszcwski P, Krzemień-Ojak Ł, Perkowska-Ptasińska A, et al. Cell-free DNA profiling in patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2020; 29: 1759–72. Available from: <https://doi.org/10.1177/0961203320957717>.
 10. Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2019; 10: 502. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00502>.
 11. Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med*. 2022; 54: 91–102. Available from: <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00736-w>.
 12. Dong Y, Ming B, Dong L. The Role of HMGB1 in Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2022; 13: 815257. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.815257>.
 13. Liu T, Son M, Diamond B. HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2020; 11: 1057. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01057>.
 14. Infantino M, Nagy E, Bizzaro N, Fischer K, Bossuyt X, Damoiseaux J. Anti-dsDNA antibodies in the classification criteria of systemic lupus erythematosus. *Journal of Translational Autoimmunity*. 2022; 5: 100139. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2021.100139>.
 15. Sokolova MV, Schett G, Steffen U. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis: Historical Background and Novel Findings. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2021; 63: 138–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08890-1>.
 16. Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13: R71. Available from: <https://doi.org/10.1186/ar3332>.
 17. Wirestam L, Schierbeck H, Skogh T, Gunnarsson I, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, et al. Antibodies against High Mobility Group Box protein-1 (HMGB1) versus other anti-nuclear antibody fine-specificities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17: 338. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0856-2>.
 18. Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, Qureshi AR, Gallowitsch-Puerta M, Patel NB, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2007; 13: 210–5. Available from: <https://doi.org/10.2119/2006-00108.Goldstein>.
 19. Wang C, Miao Y, Wu X, Huang Y, Sun M, Zhu Y, et al. Serum HMGB1 Serves as a Novel Laboratory Indicator Reflecting Disease Activity and Treatment Response in Ankylosing Spondylitis Patients. *Journal of Immunology Research*. 2016; 2016: 1–8. Available from: <https://doi.org/10.1155/2016/6537248>.
 20. Yildirim D, Baykul M, Edek YC, Gulengul M, Alp GT, Eroglu FS, et al. Could Serum HMGB1 Levels be a Predictor Associated with Psoriatic Arthritis? *Biomark Med*. 2023; 17: 871–80. Available from: <https://doi.org/10.2217/bmm-2023-0490>.
 21. Lu M, Yu S, Xu W, Gao B, Xiong S. HMGB1 Promotes Systemic Lupus Erythematosus by Enhancing Macrophage Inflammatory Response. *Journal of Immunology Research*. 2015; 2015: 1–12. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/946748>.
 22. Tanaka A, Ito T, Kibata K, Inagaki-Katashiba N, Amuro H, Nishizawa T, et al. Serum high-mobility group box 1 is correlated with interferon- α and may predict disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2019; 28: 1120–7. Available from: <https://doi.org/10.1177/0961203319862865>.
 23. Lee H-T, Lin C-S, Pan S-C, Chen W-S, Tsai C-Y, Wei Y-H. The Role of Plasma Cell-Free Mitochondrial DNA and Nuclear DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022; 27: 333. Available from: <https://doi.org/10.31083/j.fbl2712333>.
 24. Rykova E, Sizikov A, Roggenbuck D, Antonenko O, Bryzgalov L, Morozkin E, et al. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res Ther*. 2017; 19: 85. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1295-z>.
 25. Li Z, Lin J, Su Z, Zeng Y, Zhou Y, Li J, et al. Neutrophil Extracellular Traps-Associated RNA Impedes CD4+ Treg Differentiation by TLR7 – IRF7 Axis in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatology*. 2025; 77: 1242–53. Available from: <https://doi.org/10.1002/art.43166>.
 26. Peng Y, Wu Y, Chen S, Liu Y, Qian H, He Y, et al. Circulating cell-free DNA correlate to disease activity and treatment response of patients with radiographic axial spondyloarthritis. *Sci Rep*. 2024; 14: 178. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50543-0>.

References

1. Carter EE, Barr SG, Clarke AE. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12: 605–20. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.137>.
2. Black RJ, Cross M, Haile LM, Culbreth GT, Steinmetz JD, Hagins H, et al. Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*. 2023; 5: e594–610. Available from: [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(23\)00211-4](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00211-4).
3. Wang R, Ward MM. Epidemiology of axial spondyloarthritis: an update. *Current Opinion in Rheumatology*. 2018; 30: 137–43. Available from: <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000475>.
4. Boel A, López-Medina C, Van Der Heijde DMFM, Van Gaalen FA. Age at onset in axial spondyloarthritis around the world: data from the Assessment in SpondyloArthritis international Society Peripheral Involvement in Spondyloarthritis study. *Rheumatology*. 2022; 61: 1468–75. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keab544>.
5. Lembke S, Macfarlane GJ, Jones GT. The worldwide prevalence of psoriatic arthritis — a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology*. 2024; 63: 3211–20. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keae198>.
6. Лила АМ, Лила ВА. Социальная значимость и экономические последствия ревматических заболеваний. *Гигиена и санитария*. 2017; 96: 387–92. Available from: <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2017-96-4-387-392>. Russian.
7. Danieli MG, Antonelli E, Piga MA, Claudi I, Palmeri D, Tonacci A, et al. Alarmins in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 2022; 21: 103142. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103142>.
8. Ermakov EA, Tolmacheva AS, Kon'kov VV, Melamud MM, Sizikov AE, Klyaus NA, et al. Plasma high-mobility group nucleosome-binding domain 1 (HMGN1) protein levels in four common rheumatic diseases: A potential biomarker of rheumatoid arthritis. *The Egyptian Rheumatologist*. 2025; 47: 51–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2024.12.003>.
9. Truszcwska A, Wirkowska A, Gala K, Truszcwski P, Krzemień-Ojak Ł, Perkowska-Ptasińska A, et al. Cell-free DNA profiling in patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2020; 29: 1759–72. Available from: <https://doi.org/10.1177/0961203320957717>.
10. Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2019; 10: 502. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00502>.

11. Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med*. 2022; 54: 91–102. Available from: <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00736-w>.
12. Dong Y, Ming B, Dong L. The Role of HMGB1 in Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2022; 13: 815257. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.815257>.
13. Liu T, Son M, Diamond B. HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2020; 11: 1057. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01057>.
14. Infantino M, Nagy E, Bizzaro N, Fischer K, Bossuyt X, Damoiseaux J. Anti-dsDNA antibodies in the classification criteria of systemic lupus erythematosus. *Journal of Translational Autoimmunity*. 2022; 5: 100139. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2021.100139>.
15. Sokolova MV, Schett G, Steffen U. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis: Historical Background and Novel Findings. *Clinic Rev Allerg Immunol*. 2021; 63: 138–51. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08890-1>.
16. Abdulahad DA, Westra J, Bijzet J, Limburg PC, Kallenberg CG, Bijl M. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13: R71. Available from: <https://doi.org/10.1186/ar3332>.
17. Wirestam L, Schierbeck H, Skogh T, Gunnarsson I, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, et al. Antibodies against High Mobility Group protein-1 (HMGB1) versus other anti-nuclear antibody fine-specificities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17: 338. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0856-2>.
18. Goldstein RS, Bruchfeld A, Yang L, Qureshi AR, Gallowitsch-Puerta M, Patel NB, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) serum levels in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Med*. 2007; 13: 210–5. Available from: <https://doi.org/10.2119/2006-00108.Goldstein>.
19. Wang C, Miao Y, Wu X, Huang Y, Sun M, Zhu Y, et al. Serum HMGB1 Serves as a Novel Laboratory Indicator Reflecting Disease Activity and Treatment Response in Ankylosing Spondylitis Patients. *Journal of Immunology Research*. 2016; 2016: 1–8. Available from: <https://doi.org/10.1155/2016/6537248>.
20. Yildirim D, Baykul M, Edek YC, Gulengul M, Alp GT, Eroglu FS, et al. Could Serum HMGB1 Levels be a Predictor Associated with Psoriatic Arthritis? *Biomark Med*. 2023; 17: 871–80. Available from: <https://doi.org/10.2217/bmm-2023-0490>.
21. Lu M, Yu S, Xu W, Gao B, Xiong S. HMGB1 Promotes Systemic Lupus Erythematosus by Enhancing Macrophage Inflammatory Response. *Journal of Immunology Research*. 2015; 2015: 1–12. Available from: <https://doi.org/10.1155/2015/946748>.
22. Tanaka A, Ito T, Kibata K, Inagaki-Katashiba N, Amuro H, Nishizawa T, et al. Serum high-mobility group box 1 is correlated with interferon- α and may predict disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2019; 28: 1120–7. Available from: <https://doi.org/10.1177/0961203319862865>.
23. Lee H-T, Lin C-S, Pan S-C, Chen W-S, Tsai C-Y, Wei Y-H. The Role of Plasma Cell-Free Mitochondrial DNA and Nuclear DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022; 27: 333. Available from: <https://doi.org/10.31083/j.fbl2712333>.
24. Rykova E, Sizikov A, Roggenbuck D, Antonenko O, Bryzgalov L, Morozkin E, et al. Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Res Ther*. 2017; 19: 85. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1295-z>.
25. Li Z, Lin J, Su Z, Zeng Y, Zhou Y, Li J, et al. Neutrophil Extracellular Traps-Associated RNA Impedes CD4+ Treg Differentiation by TLR7 – IRF7 Axis in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatology*. 2025; 77: 1242–53. Available from: <https://doi.org/10.1002/art.43166>.
26. Peng Y, Wu Y, Chen S, Liu Y, Qian H, He Y, et al. Circulating cell-free DNA correlate to disease activity and treatment response of patients with radiographic axial spondyloarthritis. *Sci Rep*. 2024; 14: 178. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50543-0>.

ФОЛЛИКУЛЯРНЫЕ Т-КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ: НАРАСТАЮЩАЯ СЛОЖНОСТЬ И ПЕРВООЧЕРЕДНЫЕ ВОПРОСЫ

И. Л. Григорова ✉

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

Фолликулярные Т-хелперы (Tfh) и фолликулярные регуляторные Т-клетки (Tfr) играют ключевую роль в индукции и контроле В-клеточных ответов, включая формирование высокоаффинного гуморального иммунитета, переключение классов антител и предотвращение аутореактивности. Успешный ответ Tfh ассоциирован с эффективной выработкой нейтрализующих антител после вакцинации и эффективной элиминацией различных патогенов. В то же время дисрегуляция фолликулярных Т-клеток часто связана с аутоиммунными заболеваниями и аллергическими реакциями. Нарушение их нормального функционирования связано также с формированием эктопических лимфоидных структур (ЭЛС), способствует развитию некоторых сосудистых патологий и имеет прогностическое значение при ряде онкологических заболеваний. В связи с этим анализ субпопуляций фолликулярных Т-клеток в периферической крови человека все чаще используют при изучении механизмов различных заболеваний. В данной статье обсуждаются современные данные о разных типах фолликулярных Т-клеток, их функциях и методах анализа субпопуляций фолликулярных Т-клеток, циркулирующих в крови человека. Согласно мнению автора, центральными нерешенными вопросами остаются точное фенотипическое определение циркулирующих субпопуляций Tfr-клеток, выяснение иерархии их развития от клеток-предшественников до зрелых регуляторных форм и установление их анатомических ниш дифференцировки. Накопление необходимых сведений и их преобразование в надежные сигнатуры для клеток периферической крови необходимы для развития подходов прогнозирования исхода заболевания у отдельных пациентов и разработки персонализированных терапевтических подходов.

Ключевые слова: фолликулярные хелперные Т-клетки, Tfh, фолликулярные регуляторные Т-клетки, Tfr, циркулирующие фолликулярные Т-клетки, инфекционные заболевания, вакцины, аллергия, аутоиммунные заболевания, онкологические заболевания

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

Благодарности: автор выражает признательность И. В. Звягину за помощь с редактированием статьи.

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

Статья получена: 10.12.2025 **Статья принята к печати:** 12.12.2025 **Опубликована онлайн:** 23.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.076

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/>).

FOLLICULAR T CELLS IN PERIPHERAL BLOOD: INCREASING COMPLEXITY AND KEY QUESTIONS

Grigorova IL ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Follicular helper (Tfh) and follicular regulatory (Tfr) T cells play critical roles in inducing and controlling B cell responses, including the generation of high-affinity humoral immunity, the antibody class-switching, and the prevention of autoreactivity. Successful Tfh responses are linked to robust vaccine-induced neutralizing antibody production and efficient clearance of various pathogens. Conversely, dysregulation of follicular T cells is often linked to autoimmune diseases and allergic reactions. Furthermore, these cells are implicated in the formation of ectopic lymphoid structures (ELS), contribute to certain vascular pathologies, and hold prognostic value in several cancers. Consequently, the analysis of follicular T cell subpopulations in human peripheral blood is increasingly utilized to investigate the mechanisms underlying various diseases. In this opinion article, the current understanding of follicular T cell subsets, their functions, and the evolving methods for analyzing their circulating counterparts in human blood are discussed. In the author's opinion, the central unresolved questions remaining in the field are the precise phenotypic definition of circulating Tfr cell subpopulations, the elucidation of their developmental trajectory from precursors cells to mature regulatory forms, and the identification of their anatomical differentiation niches. The collection and translation of these essential data into reliable cellular signatures for peripheral blood analysis are critical for advancing personalized patient prognosis and developing tailored therapies.

Keywords: follicular helper T cells (Tfh), follicular regulatory T cells (Tfr), circulating follicular T cells, infectious diseases, vaccines, allergies, autoimmune diseases, oncology

Funding: this research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 24-15-00545).

Acknowledgments: the author is grateful to I. V. Zvyagin for assistance with editing the article.

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

Received: 10.12.2025 **Accepted:** 12.12.2025 **Published online:** 23.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.076

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/>).

Фолликулярные Т-клетки, которые локализуются в В-клеточных фолликулах и участвуют в регуляции В-клеточного и антительного ответа, были впервые описаны в 1999 г. [1]. С тех пор эти клетки стали объектом активных исследований, что в итоге привело к формированию целой научной области, посвященной их роли в развитии различных заболеваний и патологических состояний. Анализ ассоциации риска развития и прогресса различных

заболеваний с нарушениями функционирования и баланса субпопуляций фолликулярных Т-клеток, циркулирующих в периферической крови, все чаще становится важным инструментом для прогноза и определения потенциальных мишеней для терапии при множественных заболеваниях [2, 3].

Центральной особенностью фолликулярных Т-клеток является их зависимость от транскрипционного фактора

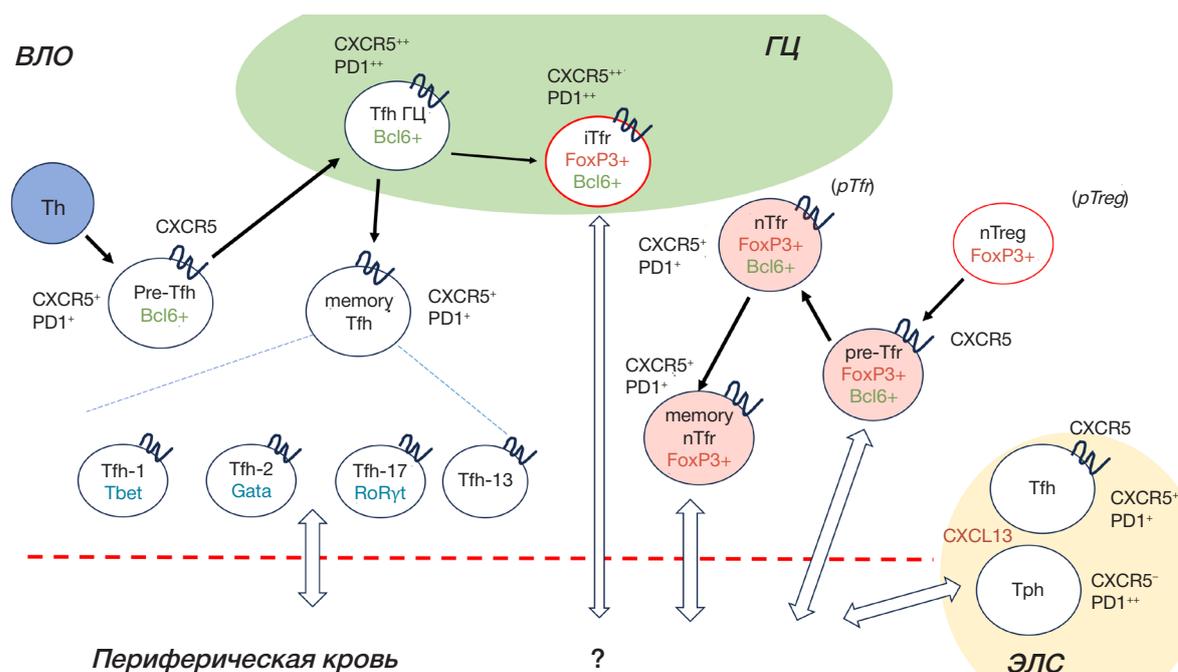


Рис. Основные фолликулярные и фолликулярно-подобные Т-клетки человека. Схема, описывающая образование во вторичных лимфоидных органах (ВЛО) и возможную рециркуляцию в периферической крови основных субпопуляций фолликулярных Т-клеток: хелперных (Тfh) и регуляторных (Тfr). ГЦ — герминативные центры. ЭЛО — эктолимфоидные структуры. Фолликулярные Т-клетки памяти, которые приобретают способность выходить в циркуляцию, снижают экспрессию Bcl6 и поверхностную экспрессию CXCR5 и PD1 по сравнению с Т-клетками в ГЦ. Периферические хелперные Т-клетки (Тph) и в некоторой степени Тfh накапливаются в ЭЛО, где они производят хемокин CXCL13, который может привлекать В-клетки

Bcl6 и повышенная экспрессия рецептора CXCR5 (рисунок, таблица). Рецептор CXCR5 позволяет Т-клеткам мигрировать в фолликулы вторичных лимфоидных органов (ВЛО), где стромальные клетки экспрессируют его лиганд, хемокин CXCL13. Два основных типа фолликулярных Т-клеток, дифференцирующихся в ответ на антигенный стимул из хелперных Т-клеток (Th) и регуляторных Т-клеток (Treg), называются фолликулярными Т-хелперами (Tfh) и фолликулярными регуляторными Т-клетками (Tfr) соответственно.

Tfh-клетки критически важны для поддержания долгосрочного высокоаффинного В-клеточного и антительного ответов, поскольку они необходимы для реакций в герминативных центрах (ГЦ) ВЛО. Tfh избирательно предоставляют ключевые сигналы помощи (CD40L, цитокины IL-21 и IL-4) тем В-клеткам ГЦ, которые имеют наибольшую плотность комплексов пептид-МНСII для распознавания Т-клеточными рецепторами Tfh. Это взаимодействие обеспечивает выживание и пролиферацию В-клеточных клонов с высокой аффинностью к антигену и, таким образом, управляет аффинным созреванием В-клеток ГЦ. Кроме того, Tfh поддерживают переключение изотипов иммуноглобулинов В-клеток, формирование В-клеток памяти и дифференцировку В-клеток в плазматические клетки [4].

В отличие от Tfh, Tfr-клетки участвуют в контроле иммунной толерантности В-клеточного ответа. Кроме того, Tfr способны подавлять переключение изотипа в IgA и IgE и дифференцировку В-клеток в плазматические клетки. Они также играют важную роль в тонкой настройке аффинного созревания В-клеток [5].

По современным представлениям, большая часть Tfh-клеток дифференцируется из специфичных к чужеродным антигенам Th-лимфоцитов, тогда как предшественниками Tfr-клеток долгое время считали классические Treg тимусного происхождения, экспрессирующие транскрипционный фактор FoxP3 и

способные распознавать аутоантигены (nTreg). Считалось, что в отдельных случаях, предшественниками Tfr могут также служить периферически индуцированные из Th-клеток регуляторные Т-клетки (pTreg). Однако недавно проведенные исследования показали, что Tfh в ГЦ также способны повышать экспрессию FoxP3, превращаясь в Tfr. Такие клетки получили название индуцированных iTfr [6, 7] (рисунок, таблица).

Учитывая ключевую роль, которую Tfh и Tfr играют в регуляции В-клеточного ответа, формировании памяти и обеспечении высокоаффинного гуморального иммунитета, их функции активно исследуют в экспериментальных моделях на животных и в контексте различных заболеваний человека. Функции Tfh-клеток были детально изучены на моделях различных хронических и острых инфекций на животных [2, 3]. Параллельно их роль была исследована при различных инфекциях у человека, включая стрептококковую (*S. pyogenes*), малярию, ВИЧ, флавивирусные инфекции и COVID-19 [2, 3, 8]. Вакцинация человека (например, сезонной противогриппозной или мРНК-вакциной против SARS-CoV-2) предоставила возможность изучить роль Tfh и их связь с продукцией нейтрализующих антител [2, 3, 9]. Дизрегуляция фолликулярных Т-клеток также является важным направлением исследований при аутоиммунных заболеваниях, охватывающих как опосредованные аутоантителами, так и обусловленные Т-лимфоцитами патологии, а также при аллергических процессах. Кроме того, показана связь Tfh-клеток с развитием ряда сердечно-сосудистых патологий, а также с положительным прогнозом при определенных онкологических заболеваниях при наличии Tfh в опухоли [2, 3, 9, 10].

Анализ динамики представленности фолликулярных Т-клеток на фоне реализации нормального или патологического иммунного ответа у человека проводят преимущественно на субпопуляциях, циркулирующих в периферической крови. Поскольку Tfh-клетки ГЦ не обладают способностью выходить из ВЛО, большинство

Таблица 1. Основные типы фолликулярных и фолликулярно-подобных Т-клеток, регулирующих В-клеточные ответы

Тип клеток	Клетки-предшественники	Антиген	Основные ТФ	Цитокины	Поверхностные маркеры	Локализация	Периферическая кровь
Pre-Tfh	Th	чужеродный антиген	Bcl6+		CXCR5+ PD1+ ICOS+	ВЛО	Нет
Tfh ГЦ	Pre-Tfh	чужеродный антиген	Bcl6+	IL21 IL4 CXCL13	CXCR5++ PD1++ ICOS++	ГЦ в ВЛО	Нет
Tfh-клетки памяти	Tfh ГЦ	чужеродный антиген	Bcl6-	CXCL13	CXCR5+ PD1+ ICOS+	Фолликулы в ВЛО/ЭЛС	cTfh
Tfh-1			Tbet+	IFN γ	CXCR3+ CCR6-	ВЛО	cTfh-1
Tfh-2			Gata+	IL4, IL5	CXCR3- CCR6-		cTfh-2
Tfh-17			RoRyt+	IL17, IL22	CXCR3- CCR6+		cTfh-17
Tfh-13		аллерген		IL4, IL13			cTfh-13
Trh			Blimp1+ MAF	IL21 CXCL13	CXCR5- PD1++ CR2	ЭЛС/воспаленные ткани	cTrh
Pre-Tfr	nTreg	ауто-антиген	Bcl6+ FoxP3+		CXCR5+ PD1+ ICOS+ CD45RA+	ВЛО	Нет
Pre-Tfr-клетки памяти	Pre-Tfr?		Bcl6- FoxP3+		CXCR5+ PD1+ ICOS+ CD45RA+	ВЛО	cPre-Tfr
nTfr	Pre-Tfr	ауто-антиген	Bcl6+ FoxP3+ Blimp1+	IL10	CXCR5+ PD1+ ICOS+ CD45RA- CD25 ^{high}	Фолликулы в ВЛО, вокруг ГЦ	Нет
nTfr-клетки памяти	nTfr	ауто-антиген	Bcl6- FoxP3+		CXCR5+ PD1+ ICOS+ CD45RA- CD25 ^{high}	ВЛО	cTfr?
iTfr	Tfh ГЦ	чужеродный антиген	Bcl6+ FoxP3+		CXCR5++ PD1++ CD38+	ГЦ	?

Примечания: ГЦ — герминативные центры, ТФ — факторы транскрипции, ВЛО — вторичные лимфоидные органы, ЭЛС — эктопические лимфоидные структуры.

циркулирующих в крови CXCR5⁺ Т-клеток представляют собой Bcl6⁻ Tfh-клетки памяти, которые снизили экспрессию CXCR5 (рисунок, таблица). Эти циркулирующие Tfh (cTfh) могут быть дополнительно разделены на функциональные субпопуляции, ассоциированные с Th1-, Th2- и Th17-ответами, на основе экспрессии хемокиновых рецепторов (CCR6, CXCR3) и профиля экспрессии соответствующих транскрипционных факторов (таблица) [11]. Кроме того, анализ продукции цитокинов позволил выявить дополнительную субпопуляцию IL-13⁺ cTfh-клеток, ассоциированную с выработкой высокоаффинных аллерген-специфических IgE-антител [12].

Примечательно, что человеческие cTfh сами активно экспрессируют хемокин CXCL13. На этом основана гипотеза, согласно которой cTfh, мигрируя в периферические ткани, могут инициировать формирование эктопических лимфоидных структур (ЭЛС), создавая градиент CXCL13, который привлекает В-клетки и запускает процесс формирования лимфоидной ткани. Однако в недавних исследованиях было также показано обогащение в ЭЛС отдельной субпопуляции CXCL13⁺ Т-клеток с фенотипом CXCR5⁻ PD1^{high} IL-21⁺. Эти клетки, названные

периферическими Т-хелперами (Trh), фенотипически схожи с Tfh и также способны поддерживать В-клеточные ответы, несмотря на отсутствие рецептора CXCR5. Кроме того, была установлена выраженная ассоциация между циркулирующими в крови Trh и такими заболеваниями, как ревматоидный артрит и системная красная волчанка. Накопленные к настоящему времени сведения не позволяют установить клеточное происхождение Trh [2, 3]. Однако на сегодняшний день Trh стали стандартным компонентом при анализе фолликулярных Т-лимфоцитов периферической крови при различных состояниях [11].

Открытие FoxP3⁺ Tfr, состоявшееся позднее, потребовало пересмотра ранее полученных данных, при анализе которых исходно все CXCR5⁺ Т-клетки автоматически причисляли к производным Tfh. Циркулирующие Tfr с фенотипом CD4⁺ CXCR5⁺ FoxP3⁺ были идентифицированы в крови мышей вскоре после иммунизации [13]. Исследования на людях также продемонстрировали значительное увеличение уровня циркулирующих Tfr после вакцинации [9]. В настоящее время считается, что эти клетки представляют собой циркулирующую популяцию Tfr-клеток памяти (cTfr), способную к длительному сохранению

in vivo и потенциальному рекрутингу во ВЛО при повторном иммунном ответе. Важная роль Tfr в регуляции иммунного ответа обеспечивает большое внимание к представленности этой популяции в периферической крови. Ключевым прогностическим параметром при этом считается соотношение cTfr/cTfh, которое, как показано в некоторых исследованиях, лучше коррелирует с дисрегуляцией гуморального ответа, чем уровень каждой из этих субпопуляций по отдельности [14].

Углубленный анализ циркулирующих Tfr показал, что значительная часть CD4⁺CXCR5⁺FoxP3⁺-клеток крови, образовавшихся во ВЛО в ответ на иммунологический вызов, представляют собой промежуточную, не полностью дифференцированную форму Tfr-клеток, экспрессирующую маркер CD45RA. Эти долгоживущие клетки, называемые pre-Tfr, могут при стимуляции созреть в эффективные регуляторы В-клеточных ответов, а также приобретать некоторую способность к заживлению ран [9]. Помимо pre-Tfr, в периферической крови обнаруживаются более зрелые эффекторные CD45RA⁻CD4⁺CXCR5⁺FoxP3⁺ cTfr (рисунок, таблица).

В ходе одного из недавних исследований был проведен отдельный анализ этих субпопуляций Tfr в периферической крови пациентов с COVID-19. Использовали метод высокоразмерной масс-цитометрии (CyTOF), позволивший провести одновременный анализ большого количества различных субпопуляций иммунных клеток в образцах пациентов. Были выявлены множественные корреляции между различными клеточными параметрами, включая отрицательную корреляцию представленности cTfr и плазматических клеток, а также Tph [10]. В целом, накапливающиеся данные указывают на возможность определения мультипараметрических сигнатур, описывающих многообразие фолликулярных Т-клеток и имеющих прогностическое значение, а также позволяющих детектировать специфические дефекты В-клеточного и антительного ответа. На первоначальном этапе для формирования таких сигнатур потребуются данные, получаемые с помощью транскриптомики/протеомики единичных клеток и/или в комплексе с CyTOF, с возможной дальнейшей редукцией анализа для метода проточной цитометрии.

Хотя рост разрешающей способности методов анализа фолликулярных Т-клеток в периферической крови углубляет наше понимание текущих патологических процессов, портрет циркулирующих Tfr остается неполным. Недавняя идентификация iTfr-клеток, возникающих во ВЛО

из Tfh и способствующих остановке функционирования ГЦ, поднимает важные вопросы. Попадает ли эта субпопуляция клеток, специфичная к чужеродным антигенам, в циркуляцию? Если да, то как можно отличить iTfr, которые подавляют В-клеточный ответ на чужеродные антигены/патогены, от популяции nTfr (из nTreg), которая смещена в сторону распознавания аутоантигенов и контроля аутореактивных В-клеточных ответов? В будущих исследованиях необходимо исследовать наличие iTfr в периферической крови и определить молекулярную сигнатуру, позволяющую различить циркулирующие iTfr и nTfr. Кроме того, необходимы исследования для определения стабильности Treg-фенотипа в iTfr-клетках.

Другой ключевой вопрос заключается в том, сохраняют ли циркулирующие Tfr молекулярный «отпечаток» своего тканевого происхождения и предпочтение к миграции в определенные органы и ткани. Показано, что тканерезидентные Treg экспрессируют определенные профили различных рецепторов, которые определяют их локализацию [15]. Профилирование сигнатур хемокиновых рецепторов и молекул адгезии, запечатлеваемых во время дифференцировки Tfr во ВЛО, могло бы раскрыть место их формирования и предсказать предпочитаемую тканевую локализацию. Такие сведения необходимы для понимания специализации и особенностей функционирования Tfr в различных физиологических и патологических контекстах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно сказать, что за последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в изучении различных типов фолликулярных Т-клеток, их развития, функций и связи с клеточным и гуморальным ответом на патогены, при аллергических и различных аутоиммунных заболеваниях. Однако, несмотря на накопленные сведения, очевидно, что требуются интенсивные исследования для формирования фенотипического и функционального портрета фолликулярных Т-клеток периферической крови человека и их взаимосвязей с другими типами клеток иммунной системы. В частности, остаются нерешенными два ключевых вопроса: определение молекулярных сигнатур различных субпопуляций Tfr-клеток в крови, происходящих из разных клеточных предшественников, и выяснение их тканевого происхождения. Ожидается, что разработка таких клеточных биомаркерных сигнатур могла бы улучшить прогнозирование иммунного статуса и подбор индивидуальной терапии для каждого пациента.

Литература

1. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med*. 1999; 190: 1123–34.
2. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity*. 2019; 50: 1132–48.
3. Yu D, Walker LSK, Liu Z, Linterman MA, Li Z. Targeting TFH cells in human diseases and vaccination: rationale and practice. *Nat Immunol*. 2022; 23: 1157–68.
4. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol*. 2022; 40: 413–42.
5. Sokolova S, Grigorova IL. Follicular regulatory T cell subsets in mice and humans: origins, antigen specificity and function. *Int Immunol*. 2023; dxad031.
6. Le Coz C, Oldridge DA, Herati RS, De Luna N, Garifallou J, Cruz Cabrera E, et al. Human T follicular helper clones seed the germinal center-resident regulatory pool. *Sci Immunol*. 2023; 8: eade8162.
7. Jacobsen JT, Hu W, R Castro TB, Solem S, Galante A, Lin Z, et al. Expression of Foxp3 by T follicular helper cells in end-stage germinal centers. *Science*. 2021; 373: eabe5146.
8. Flores-Pérez PN, Collazo-Llera JA, Rodríguez-Alvarado FA, Rivera-Amill V. The Emerging Role of Circulating T Follicular Helper Cells in Dengue Virus Immunity: Balancing Protection and Pathogenesis. *Viruses*. 2025; 17: 652.
9. Tulyeu J, Søndergaard JN, Priest DG, Ebihara T, Matsumoto H, Llamas-Covarrubias MA, et al. Human precursor T follicular regulatory cells are primed for differentiation into mature Tfr and

- disrupted during severe infections. *Sci Adv.* 2025; 11: eadv6939.
10. Søndergaard JN, Tulyeu J, Eda Hiro R, Shirai Y, Yamaguchi Y, Murakami T, et al. A sex-biased imbalance between Tfr, Tph, and atypical B cells determines antibody responses in COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2023; 120: e2217902120.
 11. Song W, Craft J. T Follicular Helper Cell Heterogeneity. *Annual Review of Immunology.* 2024; 42: 127–52.
 12. Gowthaman U, Chen JS, Zhang B, Flynn WF, Lu Y, Song W, et al. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science.* 2019; 365: eaaw6433.
 13. Sage PT, Alvarez D, Godec J, von Andrian UH, Sharpe AH. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J Clin Invest.* 2014; 124: 5191–204.
 14. Su R, Wang Y, Hu F, Li B, Guo Q, Zheng X, et al. Altered Distribution of Circulating T Follicular Helper-Like Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients. *Front Med (Lausanne).* 2021; 8: 690100.
 15. Jugder B-E, Park E, Du L, Jawale C, Popov N, Guo Z, et al. Tissue-specific roles of regulatory T cells: mechanisms of suppression and beyond along with emerging therapeutic insights in autoimmune indications. *Front Immunol.* 2025; 16: 1650451.

References

1. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med.* 1999; 190: 1123–34.
2. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity.* 2019; 50: 1132–48.
3. Yu D, Walker LSK, Liu Z, Linterman MA, Li Z. Targeting TFH cells in human diseases and vaccination: rationale and practice. *Nat Immunol.* 2022; 23: 1157–68.
4. Vitoria GD, Nussenzweig MC. Germinal Centers. *Annu Rev Immunol.* 2022; 40: 413–42.
5. Sokolova S, Grigorova IL. Follicular regulatory T cell subsets in mice and humans: origins, antigen specificity and function. *Int Immunol.* 2023; dxad031.
6. Le Coz C, Oldridge DA, Herati RS, De Luna N, Garifallou J, Cruz Cabrera E, et al. Human T follicular helper clones seed the germinal center-resident regulatory pool. *Sci Immunol.* 2023; 8: eade8162.
7. Jacobsen JT, Hu W, R Castro TB, Solem S, Galante A, Lin Z, et al. Expression of Foxp3 by T follicular helper cells in end-stage germinal centers. *Science.* 2021; 373: eabe5146.
8. Flores-Pérez PN, Collazo-Llerra JA, Rodríguez-Alvarado FA, Rivera-Amill V. The Emerging Role of Circulating T Follicular Helper Cells in Dengue Virus Immunity: Balancing Protection and Pathogenesis. *Viruses.* 2025; 17: 652.
9. Tulyeu J, Søndergaard JN, Priest DG, Ebihara T, Matsumoto H, Llamas-Covarrubias MA, et al. Human precursor T follicular regulatory cells are primed for differentiation into mature Tfr and disrupted during severe infections. *Sci Adv.* 2025; 11: eadv6939.
10. Søndergaard JN, Tulyeu J, Eda Hiro R, Shirai Y, Yamaguchi Y, Murakami T, et al. A sex-biased imbalance between Tfr, Tph, and atypical B cells determines antibody responses in COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2023; 120: e2217902120.
11. Song W, Craft J. T Follicular Helper Cell Heterogeneity. *Annual Review of Immunology.* 2024; 42: 127–52.
12. Gowthaman U, Chen JS, Zhang B, Flynn WF, Lu Y, Song W, et al. Identification of a T follicular helper cell subset that drives anaphylactic IgE. *Science.* 2019; 365: eaaw6433.
13. Sage PT, Alvarez D, Godec J, von Andrian UH, Sharpe AH. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *J Clin Invest.* 2014; 124: 5191–204.
14. Su R, Wang Y, Hu F, Li B, Guo Q, Zheng X, et al. Altered Distribution of Circulating T Follicular Helper-Like Cell Subsets in Rheumatoid Arthritis Patients. *Front Med (Lausanne).* 2021; 8: 690100.
15. Jugder B-E, Park E, Du L, Jawale C, Popov N, Guo Z, et al. Tissue-specific roles of regulatory T cells: mechanisms of suppression and beyond along with emerging therapeutic insights in autoimmune indications. *Front Immunol.* 2025; 16: 1650451.

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ В МОСКОВСКОМ РЕГИОНЕ

В. А. Полякова¹, Е. Е. Давыдова¹✉, А. Р. Лупарев¹, А. Д. Мацвай¹, Н. И. Гнусарева¹, М. А. Гордукова², Е. В. Галеева², А. А. Толоконцева¹, Г. А. Шипулин¹

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

² Детская городская клиническая больница № 9 имени Г. Н. Сперанского, Москва, Россия

Разнообразие и смена эпидемически значимых энтеровирусов (EV) приводит к постоянному изменению характера клинической картины и уровня заболеваемости. Цель работы — изучить случаи энтеровирусной инфекции (ЭВИ) у госпитализированных детей в период восстановления эпидемического процесса после пандемии COVID-19. Был собран клинический материал от 156 пациентов с ЭВИ различных возрастных групп. Проведено генотипирование вирусов методом секвенирования по Сэнгеру 5'UTR-VP2 и VP1 фрагментов генома. Выявлено 16 типов энтеровирусов, для одного удалось установить только вид (EV-C). Доминирующим типом EV оказался Коксаки CV-A6 — доля составила 80,6% (95% ДИ: 66,7–95,5) в 2021 г. и 36,1% (95% ДИ: 27,5–44,6) в 2022 г. Чаще всего CV-A6 вызывал кожные поражения (экзантемы и энтеровирусный везикулярный стоматит с экзантемой) и респираторные инфекции. В 2022 г. наблюдался рост доли CV-A10 — 27,0% (95% ДИ: 19,2–34,9) в 2022 г. против 6,4% (95% ДИ: 0–15,1) в 2021 г., наиболее частым проявлением CV-A10 была герпетическая ангина. Самые тяжелые случаи ЭВИ наблюдались при ECHO 6 и далее — у четверых из 11 пациентов диагностирован менингит, у остальных проявлялись неврологические симптомы (менингизм, интенсивная головная боль, рвота) на фоне лихорадки. Отмечено большое количество случаев ЭВИ, сопровождающихся присутствием в биоматериале других инфекционных агентов, что может быть связано с ослаблением иммунитета при развитии ЭВИ, чаще всего выявляли вирус герпеса 6-го типа. Нуклеотидные последовательности охарактеризованных энтеровирусов размещены в базе NCBI для возможности последующего эпидемиологического анализа циркуляции энтеровирусов на территории РФ.

Ключевые слова: энтеровирусная инфекция, эпидемически значимые энтеровирусы, вирусы Коксаки, эховирусы, энтеровирусный везикулярный стоматит с экзантемой, герпангина, коинфекция, секвенирование по Сэнгеру

Вклад авторов: В. А. Полякова, А. Р. Лупарев, А. Д. Мацвай, Н. И. Гнусарева, М. А. Гордукова, Е. В. Галеева, А. А. Толоконцева — проведение исследований; Е. Е. Давыдова, В. А. Полякова, А. Р. Лупарев — анализ литературы; Е. Е. Давыдова, А. Р. Лупарев — интерпретация данных; М. А. Гордукова, Е. В. Галеева — коллекция биоматериала; В. А. Полякова — написание текста; Е. Е. Давыдова — редактирование рукописи; В. А. Полякова — подготовка иллюстраций; Г. А. Шипулин — руководство и получение финансирования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Детской городской клинической больницы № 9 им. Г. Н. Сперанского (протокол № 44 от 19 апреля 2022 г.), проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. У всех участников исследования было получено информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Евгеньевна Давыдова
ул. Погодинская, д. 10, г. Москва, 119121, Россия, edavydova@cspfmba.ru

Статья получена: 24.11.2025 **Статья принята к печати:** 13.12.2025 **Опубликована онлайн:** 25.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.082

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/>).

ETIOLOGICAL STRUCTURE OF ENTEROVIRUS INFECTION IN CHILDREN IN THE MOSCOW REGION

Polyakova VA¹, Davydova EE¹✉, Luparev AR¹, Matsvay AD¹, Gnusareva NI¹, Gordukova MA², Galeeva EV², Tolokonцева AA¹, Shipulin GA¹

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

² Speransky Children's City Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russia

The diversity and succession of epidemiologically significant enteroviruses (EV) lead to constant changes in the clinical presentation and morbidity levels. The aim of the study is to investigate cases of EV infection in hospitalized children during the resurgence of the epidemic process following the COVID-19 pandemic. We collected clinical samples from 156 patients with EV infection across a range of ages. Virus genotyping was performed using the Sanger sequencing of the 5'UTR-VP2 and VP1 genome fragments. Sixteen types of enteroviruses were identified, with one additional case identified only to the species level (EV-C). The dominant EV type was Coxsackie CV-A6, with a share of 80.6% (95% CI: 66.7–95.5) in 2021 and 36.1% (95% CI: 27.5–44.6) in 2022. Most commonly, CV-A6 caused skin lesions (exanthema or HFMD) and respiratory manifestations. In 2022, the proportion of CV-A10 cases increased considerably to 27.0% (95% CI: 19.2–34.9) compared with 6.4% (95% CI: 0–15.1) in 2021. The most common clinical manifestation of CV-A10 was herpangina. The most severe EV infection cases were associated with ECHO 6 — four out of 11 patients were diagnosed with meningitis, while the remaining patients exhibited neurological symptoms (meningism, intense headache, vomiting) accompanied by fever. We observed a large number of EV cases accompanied by the presence of other infectious agents in biological samples, which may result from immune suppression during EV infection development. The most common of these agents was human herpesvirus 6 (HHV-6). The nucleotide sequences of the characterized enteroviruses have been deposited in the NCBI database to enable subsequent epidemiological analysis of enterovirus circulation in the Russian Federation.

Keywords: enterovirus infection, epidemiologically significant enteroviruses, hand, foot and mouth disease (HFMD), herpangina, Coxsackie viruses, Echoviruses, co-infection, Sanger sequencing

Author contribution: Polyakova VA, Luparev AR, Matsvay AD, Gnusareva NI, Gordukova MA, Galeeva EV, Tolokonцева AA — conducting the research; Davydova EE, Polyakova VA, Luparev AR — literature analysis; Davydova EE, Luparev AR — data interpretation; Gordukova MA, Galeeva EV — collection of biological samples; Polyakova VA — article authoring; Davydova EE — manuscript editing; Polyakova VA — preparation of illustrations; Shipulin GA — supervision and procurement of funding.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Children's City Clinical Hospital No. 9 named after G.N. Speransky (Minutes No. 44 of April 19, 2022), conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All participants submitted signed informed consent forms prior to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina E. Davydova
Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121, Russia, edavydova@cspfmba.ru

Received: 24.11.2025 **Accepted:** 13.12.2025 **Published online:** 25.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.082

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/>).

Энтеровирусы представляют собой разнообразную группу небольших безоболочечных вирусов с несегментированным (+)-РНК-геномом, включающую патогенные и условно-патогенные для человека вирусы видов *Enterovirus alphacoxsackie* (EV-A), *Enterovirus betacoxsackie* (EV-B), *Enterovirus coxsackiepol* (EV-C), *Enterovirus deconjuncti* (EV-D). В то время как полиовирусы, способные вызывать тяжелые формы нейропатогенеза, находятся на грани ликвидации, неполиомиелитные энтеровирусы различных видов, включающие вирусы Коксаки, эховирусы и нумерованные энтеровирусы, широко распространены и вызывают разнообразные клинические формы энтеровирусной инфекции (ЭВИ), в том числе энтеровирусный везикулярный стоматит с экзантемой (HFMD), различные виды экзантем, герпетическую ангину (энтеровирусный везикулярный фарингит), заболевания верхних и нижних дыхательных путей, геморрагический конъюнктивит, инфекции желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), эпидемическую миалгию, миоперикардит, нейроинфекции (энцефалит, менингит, острый вялый миелит) и другие формы заболеваний.

Установлена определенная корреляция между видами энтеровирусов и характерными для них клиническими проявлениями. Энтеровирусы вида EV-A преимущественно вызывают HFMD и герпетическую ангину. Энтеровирусы вида EV-B (Коксаки В, ECHO) являются доминирующими возбудителями энтеровирусного менингита. Энтеровирус D68 (вид EV-D) в основном поражает верхние и нижние дыхательные пути. Однако следует учитывать, что клиническая картина при одном типе энтеровируса может варьироваться значительно в зависимости от состояния иммунитета и других индивидуальных особенностей пациента. Около 85% случаев ЭВИ протекают бессимптомно, около 12–14% диагностируют как легкие формы и только 1–3% имеют тяжелое течение [1, 2]. Клинические проявления ассоциированы также с определенными возрастными группами. У взрослых пациентов заболевание часто протекает как легкая респираторная или кишечная инфекция, у детей развивается HFMD, герпетическая ангина, экзантемы. К тяжелым неврологическим формам, таким как энтеровирусный менингит, предрасположены дети 3–14 лет [2].

Наблюдения за ЭВИ показывают, что существуют различные модели циркуляции отдельных типов энтеровирусов, например, ECHO 9, ECHO 30, EV-D 68 имеют тенденцию к вспышкам, тогда как CV-B4 и некоторые другие типы имеют относительно стабильную циркуляцию [2, 3].

Смена многообразных эпидемически значимых типов энтеровирусов может быть обусловлена различными факторами, однако она сопровождается изменением уровня заболеваемости и характера клинической картины ЭВИ, что указывает на необходимость постоянного наблюдения за циркуляцией и активностью вируса. Мониторинг активности различных типов и их распространенности позволяет предсказать возникновение вспышек или увеличение случаев тяжелых форм заболеваний [1, 4].

Снижение активности циркуляции энтеровирусов в 2020 г. из-за противоэпидемических мероприятий, связанных с COVID-19, привело к росту доли населения, не имеющего иммунитета к энтеровирусной инфекции, что способствовало более активному распространению инфекции в последующие годы. Так, согласно данным официальной статистики в Российской Федерации (РФ), регистрируется рост заболеваемости ЭВИ, в 2024 г. зарегистрирован 21 491 случай (14,69 на 100 тыс. населения),

что превышает средний многолетний показатель (СМП) в 1,5 раза [5].

До пандемии большую значимость в РФ имели энтеровирусы вида EV-B, включая ECHO 30, имеющие высокий риск развития менингитов, однако после снижения циркуляции энтеровирусов в 2020 г. доля EV-B значительно снизилась, отмечается рост заболеваемости, связанный с EV-A, прежде всего серотипами Коксаки А6 и А10 [2, 6]. По данным молекулярно-генетического мониторинга в РФ доля CV-A6 в отдельные годы достигала 40% [2, 7]. В связи с этим изменилась и структура форм ЭВИ, участились случаи герпангин и экзантем, особенно у детей первых лет жизни [6]. Так в Иркутской области в 2023 г. основной клинической формой ЭВИ являлась герпангина (39,9%) и энтеровирусный везикулярный стоматит с экзантемой (28,9%) [8].

Цель работы — изучение случаев ЭВИ у детей, госпитализированных в стационары Московского региона в период восстановления эпидемического процесса (2021–2023 гг.) для оценки циркуляции различных типов энтеровирусов с учетом вызываемой ими клинической картины инфекции.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования

Для генотипирования энтеровирусов был собран клинический материал от 156 пациентов различных возрастных групп Детской городской клинической больницы № 9 им. Г. Н. Сперанского (Москва, Россия). Критерий включения в исследование: наличие диагноза энтеровирусной инфекции. Возраст детей — 0–17 лет, 78% пациентов принадлежали возрастным группам 0–3 года и 4–6 лет. Большая часть образцов ($n = 122$) была собрана в 2022 г., дополнительно в 2021 и 2023 гг. были отобраны 31 и 3 образцов.

Образцы мазков из ротоглотки и носоглотки ($n = 137$) собирали от пациентов с симптомами ЭВИ или ОРВИ, кал ($n = 18$) собирали от пациентов с ОКИ. У одного пациента с диагнозом менингит был отобран образец ликвора ($n = 1$). От каждого пациента исследовали только один вид клинического материала.

Образцы клинического материала собирали и хранили при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до начала испытания.

Информация о месте проведения исследования

Исследование образцов методом ПЦР на наличие РНК энтеровирусов и других инфекционных агентов проводили на базе лабораторно-диагностического отделения ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ». Генотипирование энтеровирусов проводили на базе центра постгеномных технологий ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Пробоподготовка биологического материала

Образцы мазков и ликвора не требовали пробоподготовки перед экстракцией РНК. Для приготовления экстракта кала около 0,1 г (0,1 мл) кала ресуспендировали в 0,8 мл фосфатно-солевого буфера (WWR International, LLC, США). Гомогенную суспензию центрифугировали при 10 000 g на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин, супернатант над поверхностью осадка объемом 300–400 мкл собирали и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего использования.

Подтверждение наличия РНК энтеровирусов и других инфекционных агентов в клиническом материале

Наличие энтеровирусов подтверждали с использованием набора реагентов «АмплиТест® Нейровирусы» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Россия). Наличие сопутствующих инфекций определяли с использованием наборов реагентов АмплиСенс® EBV/CMV/HHV6A/B-скрин-FL, АмплиСенс® HSV I, II-FL, АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL, АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL, АмплиСенс® MRSA-скрин-титр-FL, АмплиСенс® Streptococcus pyogenes-скрин/монитор-FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Экстракция РНК

Для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала использовали набор реагентов для диагностики *in vitro* «АмплиТест® Магно-Сорб-Комбо» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Россия). Набор основан на методе экстракции нуклеиновых кислот в присутствии частиц магнетизированной силики и рекомендован для экстракции нуклеиновых кислот в автоматическом режиме. Выделение РНК проводили с использованием станции Auto-Pure 96 (Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd., Китай). При экстракции во все исследуемые образцы добавляли по 10 мкл ВКО IC-R.

Получение кДНК

Обратную транскрипцию образцов РНК проводили с использованием набора реагентов «АмплиТест® Реверта» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Россия).

Амплификация 5'UTR-VP2 и VP1 участков генома энтеровирусов

Область VP1 амплифицировали с использованием универсальных праймеров, рекомендованных для генотипирования энтеровирусов человека EV-A, EV-B, EV-C, EV-D. Применяли двухраундовое термоциклирование с парой праймеров SO222 5'-CICCIGGIGGIAYRWACAT-3' и SO224 5'-GCATGYTIGGIACICAYRT-3' для первого раунда амплификации и парой праймеров AN88 5'-TACTGGAC CACCTGGNGGNAYRWACAT-3' и AN89 5'-CCAGCACTG ACAGCAGYNGARAYNGG-3' для второго раунда [9]. Для амплификации участка 5'UTR-VP2 генома энтеровирусов использовали олигонуклеотидные праймеры собственного дизайна — EV_S_for 5'-GTGTAGMTYRGGYYGATGAG-3' и EV_S_rev 5'-RTCHGGRAAYTCCAVYACCA-3'.

Электрофоретический анализ ПЦР продуктов и их очистка

Электрофорез ПЦР продуктов проводили в 2%-м агарозном геле. Очистку ПЦР продуктов ДНК осуществляли с использованием магнитных частиц KAPA Pure Beads (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, США). Измерение концентрации нуклеиновых кислот проводили спектрофотометрически на приборе NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, Waltham, MA, США).

Секвенирование участков генома энтеровирусов

Реакцию секвенирования по Сэнгеру осуществляли с использованием реагентов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) в полном соответствии

с протоколом производителя на приборе SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Для секвенирования ПЦР продуктов VP1 и 5'UTR-VP2 использовали внутренние праймеры AN232 5'-CCAGCACTGACAGCA 3' [9] и EV_S_in 5'-CATGGTGYGAAGAGYCTATTGAGC 3' соответственно. Анализ полученных флуоресцентно меченых фрагментов проводили на приборе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Наличие РНК энтеровирусов было подтверждено для 156 образцов клинического материала от детей с диагнозом энтеровирусной инфекции. Генотипирование по двум участкам генома удалось провести для 96 образцов энтеровирусов, результаты типирования VP1 и 5'UTR-VP2 совпали для всех образцов. Для 40 образцов генотипирование проводили только по 5'UTR-VP2-участку, а для 20 образцов по VP1 участку генома.

В базе данных NCBI GenBank были размещены нуклеотидные последовательности фрагмента VP1 (PX468781–PX468895) и региона 5'UTR-VP2 (PX491339–PX491474).

Определение типов энтеровирусов

Использовали ресурс Enterovirus Genotyping Tool Version 0.1, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands) [10] и NCBI BLAST [11].

Статистическая обработка данных

Использовали ресурс Medcalc [12] и стандартные функции программы Microsoft Excel (корпорации Microsoft). Для сравнения частоты симптомов между группами рассчитывали точный двусторонний критерий Фишера, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для выборок с малым числом наблюдений ($n < 10$) статистическое сравнение не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При генотипировании энтеровирусов, полученных из биологического материала от детей выявлено 16 различных типов энтеровирусов, для одного образца удалось установить только вид энтеровируса EV-C. Большинство исследуемых энтеровирусов принадлежали типу EV-A CV-A6, среди образцов 2021 г. их доля составила 80,6%, в 2022 г. — 36,1%. Вторым по распространенности у пациентов с ЭВИ энтеровирусом был CV-A10, количество случаев среди образцов 2021 г. составило 6,5%, а среди образцов 2022 г. 27,0%. Другие EV-A энтеровирусы в нашем исследовании выявлялись значительно реже. Вирус CV-A16 был обнаружен только у одного пациента в 2022 г.

Вирусы EV-B типов CV-A9, CV-B2, CV-B3, CV-B5, ECHO 6, ECHO 9, ECHO 11 были выявлены у 16,0% пациентов в 2021–2022 гг. Среди них доминировал ECHO 6, его доля в 2022 г. составила 9,0%.

Кроме того, выявлены три образца энтеровируса вида EV-C (два случая CV-A19 и один случай EV-C неустановленного типа) и четыре образца энтеровируса EV-D68 вида EV-D. Полученные результаты генотипирования энтеровирусов приведены в табл. 1.

Был проведен анализ взаимосвязи симптомов у пациентов с ЭВИ при инфицировании энтеровирусами различных типов. При инфицировании энтеровирусами вида EV-A (CV-A2, CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A10, CV-A16) у пациентов наблюдались сходные симптомы — HFMD, экзантемы, заболевания верхних и нижних дыхательных

Таблица 1. Результаты типирования энтеровирусов, обнаруженных в биологическом материале от детей в 2021–2023 гг. в Москве

Тип энтеровируса	2021 г.		2022 г.		2023 г.	Всего 156
	Количество пациентов, <i>n</i> = 31	Доля <i>n</i> , % (95% ДИ)	Количество пациентов, <i>n</i> = 122	Доля <i>n</i> , % (95% ДИ)	Количество пациентов <i>n</i> = 3	
Enterovirus alphacoxsackie, EV-A						
CV-A2	1	3,2 (0–9,4)	1	0,8 (0–2,4)	–	2
CV-A3	–	–	1	0,8 (0–2,4)	–	1
CV-A4	1	3,2 (0–9,4)	7	5,7 (1,6–9,9)	1	9
CV-A5	1	3,2 (0–9,4)	6	4,9 (1,1–8,8)	–	7
CV-A6	25	80,6 (66,7–95,5)	44	36,1 (27,5–44,6)	–	69
CV-A10	2	6,5 (0–15,1)	33	27,0 (19,2–34,9)	–	35
CV-A16	–	–	1	0,8 (0–2,4)	–	1
Enterovirus betacoxsackie, EV-B						
CV-A9	–	–	4	3,3 (0,12–6,4)	–	4
CV-B2	–	–	1	0,8 (0–2,4)	–	1
CV-B3	1	3,2 (0–9,4)	–	–	–	1
CV-B5	–	–	4	3,3 (0,12–6,4)	–	4
ECHO 6	–	–	11	9,0 (3,9–14,1)	–	11
ECHO 9	–	–	3	2,5 (0–5,2)	–	3
ECHO 11	–	–	1	0,8 (0–2,4)	–	1
Enterovirus coxsackiepol, EV-C						
CV-A19	–	–	1	0,8 (0–2,4)	1	2
Unknown	–	–	1	0,8 (0–2,4)	–	1
Enterovirus deconjuncti, EV-D						
EV-D68	–	–	3	2,5 (0–5,2)	1	4

путей, герпетическая ангина, желудочно-кишечные инфекции, острый геморрагический конъюнктивит. При инфицировании энтеровирусами вида EV-B (CV-A9, CV-B2, CV-B3, CV-B5, ECHO 6, ECHO 9, ECHO 11) у пациентов в основном проявлялись неврологические симптомы (менингизм, интенсивная головная боль, рвота) на фоне лихорадки, респираторных и/или кишечных симптомов. У четверых из 11 пациентов с ECHO6-инфекцией был диагностирован менингит (рис. 1).

Для достаточно представленных случаев инфекции, вызванных энтеровирусами типов CV-A6 (*n* = 69) и CV-A10 (*n* = 35), проведено сравнение частоты различных клинических проявлений (табл. 2). Достоверно показано, что в данном исследовании экзантемы развивались чаще у пациентов с CV-A6-инфекцией, чем при CV-A10 (65,2% vs 25,7%), а герпангина, наоборот, чаще отмечалась при CV-A10-инфекции (62,9% vs 23,2%).

Была изучена частота выявляемости у пациентов с ЭВИ других инфекционных агентов, в том числе вызывающих клиническую картину, схожую с ЭВИ (экзантемы, респираторные, кишечные или нейроинфекции). Исследование проводили на наличие РНК/ДНК вирусов герпеса 1-го, 2-го, 6-го типов (HSV 1/2, HHV-6), Эпштейна–Барр (EBV), цитомегаловируса (HCMV), риновирусов (HRV), респираторно-синцициального вируса (RSV), метапневмовируса (HMPV), вирусов парагриппа 1–4-го типов (HPIVs), бокавируса (HBoV), аденовирусов HAdV B, HAdV C, HAdV E и HAdV F (HAdV), коронавирусов OC43, E229, NL63, HKUI (HCoV), ротавируса A, норовируса II генотипа, астровирусов, ДНК *Shigella* spp./EIEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus* spp., *Candida albicans*.

Общее количество случаев ЭВИ, сопровождающихся присутствием других инфекционных агентов в различных

сочетаниях, составило 29,5%, однако в большинстве случаев не замечено их влияния на тяжесть течения ЭВИ. Наиболее часто выявляли вирус герпеса 6-го типа (HHV-6) — до 17% всех исследованных случаев ЭВИ. В 7% случаев наблюдалась инфекция несколькими возбудителями — смешанная вирусная инфекция, например, CV-A10 /HHV-6/EBV/HCMV, или бактериально-вирусная инфекция, например, CV-A6/*Astrovirus*/*Shigella* spp. (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При генотипировании выявленных в 2021–2022 гг. в Московском регионе у детей энтеровирусов было показано, что CV-A6 тип занимает доминирующее положение. Известно, что CV-A6 получил широкое распространение в европейских странах с 2008 г., а затем распространился в Азии и Северной Америке. Отмечаются атипичные формы CV-A6-инфекции, протекающие с необычными кожными проявлениями (экзантемы, сыпь, экзема, волдыри, онихомадезис) [13, 14]. В 2017 г. уровень распространенности CV-A6 в отдельных странах достигал 71,1% [15], масштабные вспышки зарегистрированы в Бразилии, Вьетнаме, Франции, Китае [16–20]. Доминирующее положение энтеровируса CV-A6 на территории нашей страны подтверждается данными Референс-центра, распространенность CV-A6 среди пациентов с ЭВИ составила — 13% в 2018 г., 29% в 2019 г., 40% в 2021 г., 19% в 2022 г., 34% в 2023, 17% в 2024 г [2]. По сравнению с классическим вирусом Коксаки CV-A16, бывшим ранее частой причиной HFMD [2, 21], CV-A6-инфекция характеризуется большей продолжительностью, атипичными кожными проявлениями, а также неврологическими симптомами [15, 18].

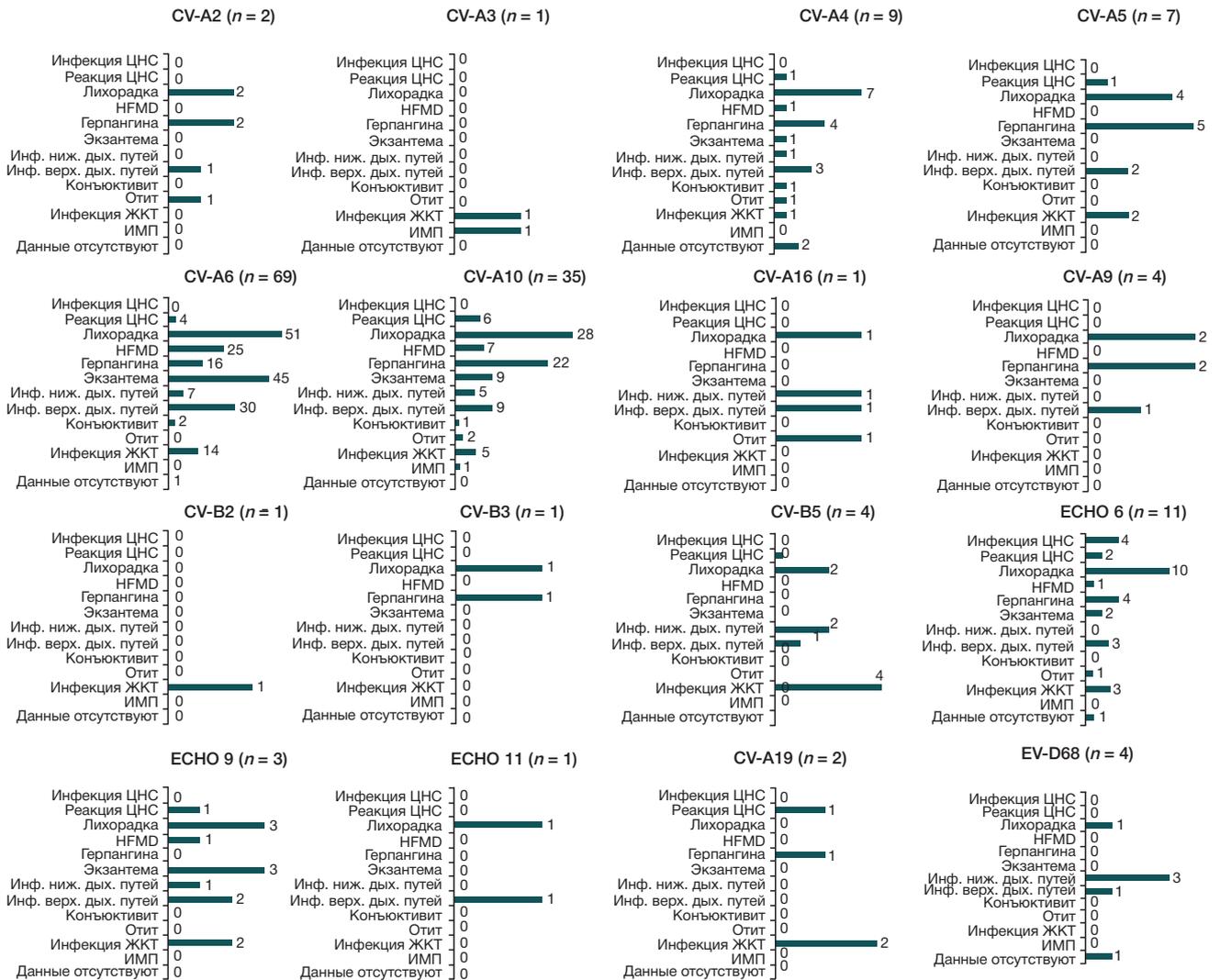


Рис. 1. Взаимосвязь клинических симптомов с типом энтеровируса. Инфекция ЦНС — инфекция центральной нервной системы (менингит); реакция ЦНС — реакция центральной нервной системы (энцефалопатия, менингизм, судороги, нарушение сознания, агноз); лихорадка (субфебрильная, фебрильная, пиретическая лихорадка); HFMD — hand, foot and mouth disease — энтеровирусный везикулярный стоматит с экзантемой; герпангина — энтеровирусный везикулярный фарингит; инф. ниж. дых. путей — инфекция нижних дыхательных путей (бронхит, пневмония); инф. верх. дых. путей — инфекция верхних дыхательных путей (ринит, фарингит, тонзиллит, трахеит); инфекция ЖКТ — инфекция желудочно-кишечного тракта (инфекционный гастрит, энтерит, колит); ИМП — инфекция мочевыводящих путей

В данном исследовании CV-A6 преимущественно вызывал экзантемы и заболевания верхних и нижних дыхательных путей, реже HFMD, герпетическую ангину, желудочно-кишечные инфекции и острый геморрагический конъюнктивит. В четырех случаях у пациентов возрастом до 3 лет (около 6% пациентов с CV-A6) инфекция протекала тяжело, сопровождалась судорогами и потерей сознания на фоне пиретической лихорадки. Из них только в одном случае выявлен сопутствующий инфекционный агент (вирус HHV-6), поэтому осложненное течение, вероятно, не связано с коинфекцией.

Показано, что по сравнению с 2021 г. в 2022 г. доля доминирующего типа CV-A6 снизилась с 80,6 до 36,1% с одновременным увеличением доли случаев CV-A10 с 6,5 до 27,0%. Полученные данные коррелируют с данными о росте числа случаев CV-A10-инфекции в регионах РФ и других странах [2, 22, 23]. В основном симптомы CV-A10 совпадали с симптомами CV-A6-инфекции, однако показана предрасположенность к развитию герпетической ангины при снижении случаев различных экзантем. У шести пациентов возрастом 0–6 лет (17% пациентов с CV-A10) наблюдались судороги и/или потеря

сознания на фоне пиретической лихорадки, только у двух из них выявлены сопутствующие инфекционные агенты (HHV-6, HAdV). Случаев развития менингита в данном исследовании при CV-A10 не отмечено, хотя такие случаи были описаны ранее, по опубликованным данным CV-A10 инфекция протекает тяжелее, чем CV-A6 или CV-A16 [22].

Отдельно стоит отметить, что у двух пациентов с CV-A10 и CV-A3 энтеровирусной инфекцией наблюдалось достаточно редкое осложнение — развитие инфекций мочевыводящих путей (ИМП). Цитопатогенное действие энтеровирусов на клетки почечной ткани было описано ранее, что указывает на возможность вовлечения в патологический процесс органов мочевой системы [24].

Среди энтеровирусов вида EV-B наибольшая доля принадлежит ECHO 6, все они были обнаружены у пациентов в 2022 г., что коррелирует с эпидемическим подъемом ECHO 6, который наблюдался в 2022 г. на всей территории РФ [2]. Отмечена симптоматика нейроинфекции, часть пациентов перенесла менингит, у остальных наблюдались неврологические симптомы (менингизм, интенсивная головная боль, рвота) на фоне лихорадки, респираторных и/или кишечных симптомов. Один из случаев ECHO 6-

Таблица 2. Сравнение клинических симптомов при ЭВИ, вызванных CV-A6 и CV-A10 типами

Симптом	CV-A6 (n = 69)			CV-A10 (n = 35)			OR (95% ДИ)	p-value
	Кол-во	Доля пациентов с симптомом, % (95% ДИ)		Кол-во	Доля пациентов с симптомом, % (95% ДИ)			
Реакция ЦНС	4	5,8	(0,3–11,3)	6	17	(4,7–29,6)	0,3 (0,1–1,1)	0,08
Лихорадка	51	73,9	(63,5–84,3)	28	80	(66,7–93,2)	0,7 (0,3–1,9)	0,63
HFMD	25	36,2	(24,9–47,6)	7	20	(6,7–33,2)	2,3 (0,9–5,9)	0,12
Герпангина	16	23,2	(13,2–33,1)	22	62,9	(46,8–78,8)	0,2 (0,1–0,4)	< 0,001
Экзантема	45	65,2	(53,9–76,4)	9	25,7	(11,2–40,2)	5,4 (2,2–13,4)	< 0,001
Инфекции нижних дыхательных путей	7	10,1	(3,0–17,3)	5	14,3	(2,7–25,9)	0,7 (0,2–2,3)	0,53
Инфекции верхних дыхательных путей	30	43,5	(31,8–55,2)	9	25,7	(11,2–40,2)	2,2 (0,9–5,4)	0,09
Конъюнктивит	2	2,9	(0–6,9)	1	2,9	(0–8,4)	1,0 (0,1–11,6)	1
Инфекция ЖКТ	14	20,3	(10,8–29,8)	5	14,3	(2,7–25,9)	1,5 (0,5–4,6)	0,59

инфекция проявилась у ребенка как энтеровирусный везикулярный фарингит, однако по эпидемиологическому анамнезу известно, что у матери данная инфекция протекала в форме энтеровирусного менингита. Приведенный пример не согласуется с типичной клинической моделью ЭВИ, согласно которой взрослые переносят инфекцию в более легкой или бессимптомной форме, тогда как в описанной ситуации более тяжелое течение заболевания наблюдалось у родителя.

Для других энтеровирусов вида EV-B ЭВИ протекали с симптомами кишечных (гастроэнтериты, энтероколиты) и респираторных (ринит, бронхит) инфекций без нарушений работы центральной нервной системы; в отдельных случаях наблюдалось развитие герпетической ангины (CV-B3, ECHO 6) и HFMD (ECHO 6, ECHO 9). ECHO 11, который связывают с развитием неонатального сепсиса у младенцев, был выявлен только у трехлетнего пациента с симптомами респираторной инфекции. Вирус ECHO 30, являвшийся на протяжении многих лет доминирующим возбудителем энтеровирусного менингита в РФ, не был выявлен в данном исследовании, эти данные коррелируют с результатами исследований Референс-центра по мониторингу за энтеровирусными инфекциями, так как после начала пандемии COVID-19 в период 2021–2022 гг. ECHO 30 практически не выявлялся на территории РФ. Однако стоит отметить, что в следующем периоде наблюдается рост случаев ECHO 30, так в 2024 г. они составили до 8% от всех случаев ЭВИ [2].

Были также выявлены два случая инфекции вирусом CV-A19 вида EV-C. По литературным данным CV-A19 является достаточно редким возбудителем ЭВИ и может вызывать различные респираторные и кишечные инфекционные формы, герпангину, а также менингиты и острый вялый миелит [25–26]. В первом случае у пациента развилась герпетическая ангина с инфекционным энтероколитом. Во втором случае на фоне норovирусной и астровирусной коинфекции у ребенка наблюдались острый инфекционный гастроэнтерит, токсикоз, эксикоз и ацидоз, отмечены расстройство речи и логоневроз, по результатам электроэнцефалографии выявлена эпилептиформная активность. Затрагивающие ЦНС последствия, вероятно, связаны с тяжелой кишечной ко-инфекцией.

К эпидемиологически значимым энтеровирусам относится EV-D68, тоже выявленный в настоящем исследовании. Для EV-D68 наиболее характерны респираторные симптомы, однако начиная с 2014 г. его

связывают с развитием острого вялого миелита, имеющего симптомы с поражением нижних двигательных нейронов в сером веществе спинного мозга, нарушением рефлексов, дыхательной недостаточности, внезапным появлением мышечной слабости [27]. Вспышки EV-D68-инфекции, сопровождающейся развитием острого вялого паралича, миелита, миокардита, перикардита, неонатального сепсиса, пневмонии, были зафиксированы в США и Европе. В РФ единичные случаи EV-D68 регистрируются с 2018 г. Выявленные в данном исследовании случаи EV-D68 инфекции у детей 5–12 лет были сопряжены с заболеваниями респираторного тракта, включая ринофарингит, обструктивный бронхит и пневмонию.

Наши данные показывают высокую долю случаев ЭВИ, сопровождающихся присутствием других инфекционных агентов (до 30% всех случаев), что подтверждает ранее опубликованные данные о случаях коинфекций при различных формах ЭВИ. В литературе описаны случаи коинфекций при неонатальном менингите EV / HSV-1 [28], при острой энцефалопатии CV-A6 / EV-D68 / парэховирус HPeV / HHV-6 [29], при менингите и сепсисе EV / *Pasteurella multocida* [30], при HFMD синдроме EV / HSV-1, CV-A6 / HHV7, CV-A6 / CMV [31, 32], при ИМП EV / *Escherichia coli* [33].

По нашим данным в большинстве случаев коинфекция при ЭВИ была связана с возбудителями, которые могут находиться в организме в латентной форме и проявляются на фоне ослабления иммунитета — вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типов, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр, вирус герпеса 6-го типа, до 74% всех случаев обнаружения дополнительных инфекционных агентов.

Выводы

Определено, что доминирующее положение среди обнаруженных энтеровирусов у детей с ЭВИ в 2021 и в 2022 гг. в Московском регионе занимал Коксаки CV-A6, вызывающий преимущественно кожные поражения у пациентов. В 2022 г. наблюдался рост количества случаев CV-A10, для которого отмечена большая доля случаев с тяжелым течением заболевания по сравнению с CV-A6. Среди EV-B-вирусов наибольшая доля принадлежала ECHO 6, у ряда пациентов диагностирован менингит. Отмечено большое количество случаев ЭВИ, сопровождающихся присутствием в биоматериале пациентов других вирусных и бактериальных инфекционных

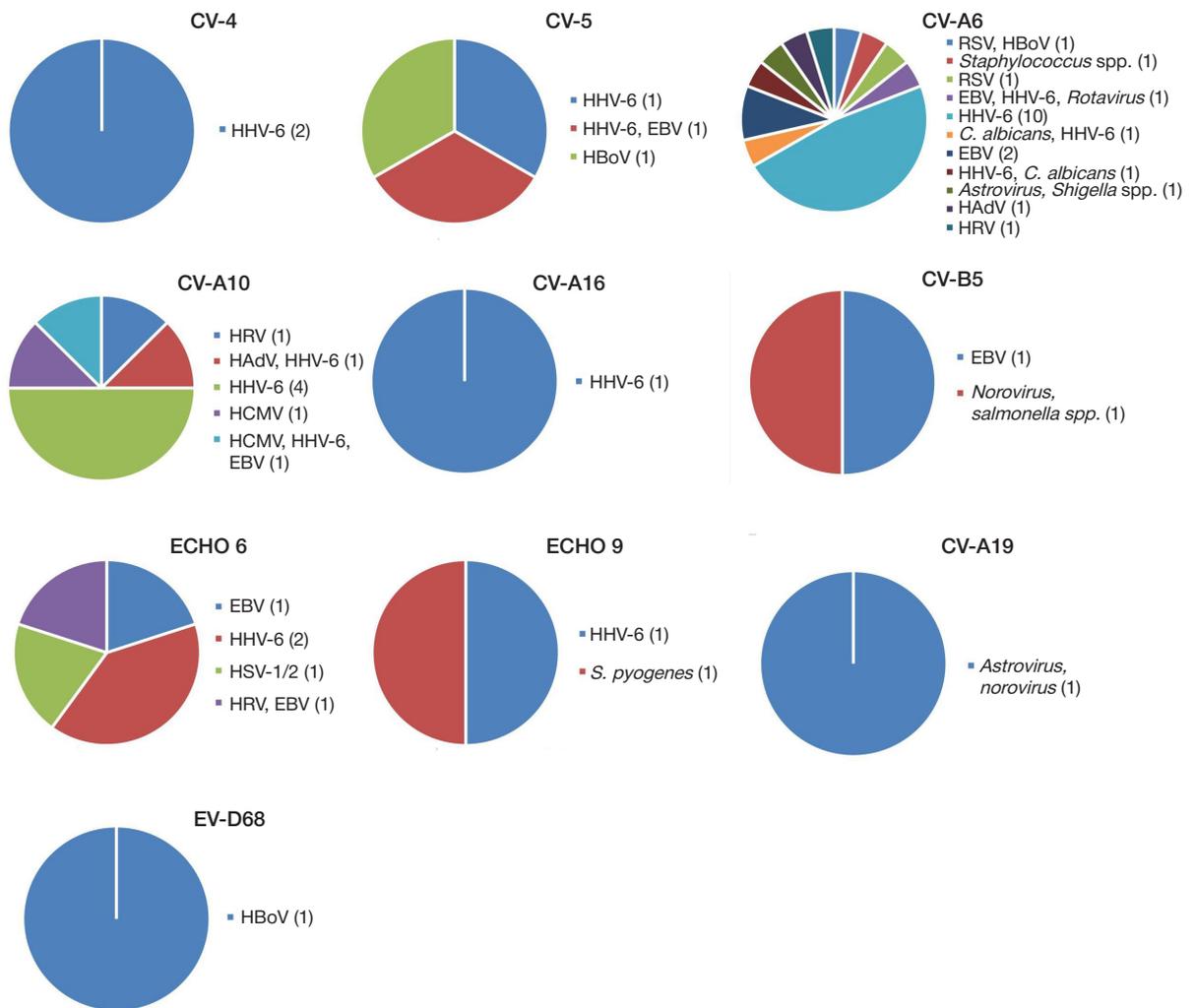


Рис. 2. Выявление различных инфекционных агентов у пациентов с ЭВИ

агентов, что может быть связано с ослаблением иммунитета при развитии ЭВИ. Нуклеотидные последовательности всех охарактеризованных энтеровирусов размещены

в открытом доступе в NCBI, что делает возможным их использование в дальнейшем для эпидемиологического анализа циркуляции энтеровирусов на территории РФ.

Литература

- Алимов А. В., Фельдблюм И.В., Акимкин В.Г., Захарова Ю.А., Сергеев А.Г., Питерский М.В. Эпидемиологический надзор и контроль энтеровирусной (неполио) инфекции: актуальные проблемы и пути решения. Екатеринбург: Юника, 2021; 181 с, ISBN 978-5-6045184-4-1.
- Информационные бюллетени ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И. Н. Блохиной». Заболеваемость и этиологическая структура энтеровирусной (неполио) инфекции. 2021–2025.
- Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance — United States, 1970–2005. *MMWR Surveill Summ*. 2006; 55 (8): 1–20. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5508a1.htm>.
- Midgley CM, Watson JT, Nix WA, Curns AT, Rogers SL, Brown BA, et al. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med*. 2015; 3 (11): 879–87. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00335-5.
- О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2024 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2025; 2025.
- Старикова П. К., Быков Р. О., Итани Т. М., Чалала В. И., Сергеев А. Г., Оленькова О. М., и др. В. Этиологическая структура энтеровирусного менингита в Екатеринбурге до и после пандемии COVID-19. *Уральский медицинский журнал*. 2024; 23 (3): 26–35. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.52420/umj.23.3.26>.
- Бутакова Л. В., Сапега Е. Ю., Троценко О. Е. Энтеровирусы — возбудители герпангины у населения Дальнего Востока России. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания*. 2025; (97): 57–68. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2025-97-57-68>.
- Сапега Е. Ю., Бутакова Л. В., Троценко О. Е. Особенности эпидемического процесса энтеровирусной инфекции в Иркутской области в 2023 году. *Здоровье населения и среда обитания — ЗНиСО*. 2024; 32 (8): 77–84. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2024-32-8-77-84>.
- Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification

- of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 (8): 2698–704. DOI: 10.1128/JCM.00542-06.
10. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011; 51 (2): 121–5. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.03.006.
 11. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
 12. MedCalc Software Ltd. Fisher exact probability. Available from: <https://www.medcalc.org/en/calc/fisher.php> (Version 23.4.5; accessed December 12, 2025).
 13. Gaunt E, Harvala H, Österback R, Sreenu VB, Thomson E, Waris M, Simmonds P. Genetic characterization of human coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: a potential role of recombination in emergence and pathogenicity. *J Gen Virol.* 2015; 96 (5): 1067–79. DOI: 10.1099/vir.0.000062.
 14. Puenpa J, Vongpunsawad S, Österback R, Waris M, Eriksson E, Albert J, et al. Molecular epidemiology and the evolution of human coxsackievirus A6. *J Gen Virol.* 2016; 97 (12): 3225–31. DOI: 10.1099/jgv.0.000619.
 15. Li X, Chen S, Chen Y, Han S, Dai B, Li T, et al. Epidemiological and genetic characterizations of hand, foot, and mouth disease and acute respiratory infections due to CV-A6 infection in Henan Province, China between 2021 and 2022. *BMC Pediatr.* 2025; 25 (1): 264. DOI: 10.1186/s12887-025-05527-6.
 16. Justino MCA, da S Mesquita D, Souza MF, Farias FP, Dos S Alves JC, Ferreira JL, et al. Atypical hand-foot-mouth disease in Belém, Amazon region, Northern Brazil, with detection of coxsackievirus A6. *J Clin Virol.* 2020; 126: 104307. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104307.
 17. Anh NT, Nhu LNT, Van HMT, Hong NTT, Thanh TT, Hang VTT, et al. Emerging coxsackievirus A6 causing hand, foot and mouth disease, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24 (4): 654–62. DOI: 10.3201/eid2404.171298.
 18. Mirand A, Cohen R, Bisseux M, Tomba S, Sellem FC, Gelbert N, et al. A large-scale outbreak of hand, foot and mouth disease, France, as at 28 September 2021. *Euro Surveill.* 2021; 26 (43): 2100978. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.43.2100978.
 19. Hu L, Maimaiti H, Zhou L, Gao J, Lu Y. Changing serotypes of hand, foot and mouth disease in Shanghai, 2017–2019. *Gut Pathog.* 2022; 14 (1): 12. DOI: 10.1186/s13099-022-00485-1.
 20. Xu S, Li H, Qiao P, Xu G, Zhao D, Lin X, et al. Neonatal hand, foot, and mouth disease due to coxsackievirus A6 in Shanghai. *BMC Pediatr.* 2020; 20 (1): 364.
 21. Zhu P, Ji W, Li D, Li Z, Chen Y, Dai B, et al. Current status of hand-foot-and-mouth disease. *J Biomed Sci.* 2023; 30 (1): 15. DOI: 10.1186/s12929-023-00908-4.
 22. Chen L, Yao XJ, Yang H, Zhang HL, Shi XL, Peng B, et al. Molecular Epidemiology of Coxsackievirus A10 Associated With Hand, Foot and Mouth Disease From 2021 to 2024 in Shenzhen, China. *J Med Virol.* 2025; 97 (8): e70552. DOI: 10.1002/jmv.70552.
 23. Lv S, Zhou Y, Ji J, Yan Y, Zhu G. Epidemiological and genetic characteristics of enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease in Jiaxing, China from 2019 to 2022. *Sci Rep.* 2025; 15 (1): 14546. DOI: 10.1038/s41598-025-99251-x.
 24. Кокорева С. П., Казарцева Н. В. Изменения мочевой системы у детей при энтеровирусной инфекции. *Российский педиатрический журнал.* 2021; 24 (3): 193–6. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.46563/1560-9561-2021-24-3-193-196>.
 25. Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol.* 2013; 14: 282–93. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.10.016.
 26. Apostol LN, Suzuki A, Bautista A, Galang H, Paladin FJ, Fuji N, et al. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the Philippines. *J Med Virol.* 2012; 84 (4): 624–31. DOI: 10.1002/jmv.23242.
 27. Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16 (5): e64–75. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00543-5.
 28. Coramusi C, Rizzoli A, Alegiani C, Bonafoni S, Auriti C, Parisi P, et al. Neonatal Meningitis Due to Herpes Simplex Virus Type 1 and Enterovirus Coinfection: Case Report and Review of the Literature. *Viruses.* 2025; 17 (6): 790. DOI: 10.3390/v17060790.
 29. Nakata K, Kashiwagi M, Masuda M, Shigehara S, Oba C, Murata S, et al. A child with acute encephalopathy associated with quadruple viral infection. *Front Pediatr.* 2015; 3: 268. DOI: 10.3389/fped.2015.00026.
 30. Aguado I, Calvo C, Wilhelmi I, Pablo-Hernando ME, Medina MJ, Sáez-Nieto JA, et al. Sepsis and meningitis caused by *Pasteurella multocida* and echovirus 9 in a neonate. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33 (12): 1308–9. DOI: 10.1097/INF.0000000000000504.
 31. Ndiaye N, Teixeira DD, Dia N, Da Silva Leite CC, Fall G, Furtado UD, et al. An outbreak of atypical hand, foot and mouth disease associated Coxsackievirus A6 in children from Cape Verde, 2023. *Virol J.* 2025; 22 (1): 48. DOI: 10.1186/s12985-025-02621-0.
 32. Hooi PS, Chua BH, Lee CS, Lam SK, Chua KB. Hand, foot and mouth disease: University Malay Medical Centre experience. *Med J Malaysia.* 2002; 57 (1): 88–91. PMID: 14569726.
 33. Calvo C, Gallardo P, Torija P, et al. Enterovirus neurological disease and bacterial coinfection in very young infants with fever. *J Clin Virol.* 2016; 85: 37–39. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.10.020.

References

1. Alimov AV, Feldblyum IV, Akimkin VG, Zaharova Yu.A, Sergeev AG, Piterskij MV. Epidemiologicheskij nadzor i kontrol' enterovirusnoj (nepolio) infekcii: aktual'nye problemy i puti resheniya. Ekaterinburg: YUnika, 2021; 181 s, ISBN 978-5-6045184-4-1. Russian.
2. Informacionnye byulleteni FBUN «Nizhegorodskij nauchno-issledovatel'skij institut epidemiologii i mikrobiologii im. akademika I. N. Blohinov». Zabolevaemost' i etiologicheskaya struktura enterovirusnoj (nepolio) infekcii. 2021–2025. Russian.
3. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Centers for Disease Control and Prevention. Enterovirus surveillance — United States, 1970–2005. *MMWR Surveill Summ.* 2006; 55 (8): 1–20. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5508a1.htm>.
4. Midgley CM, Watson JT, Nix WA, Curns AT, Rogers SL, Brown BA, et al. Severe respiratory illness associated with a nationwide outbreak of enterovirus D68 in the USA (2014): a descriptive epidemiological investigation. *Lancet Respir Med.* 2015; 3 (11): 879–87. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00335-5.
5. O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossijskoj Federacii v 2024 godu: Gosudarstvennyj doklad. M.: Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ej i blagopoluchiya cheloveka, 2025; 2025. Russian.
6. Starikova PK, Bykov RO, Itani TM, Chhalapa VI, Sergeev AG, Olen'kova OM, i dr. V. Etiologicheskaya struktura enterovirusnogo meningita v Ekaterinburge do i posle pandemii COVID 19. *Ural'skij medicinskij zhurnal.* 2024; 23 (3): 26–35. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.52420/umj.23.3.26>. Russian.
7. Butakova LV, Sapega EYu, Trocenko OE. Enterovirusy — vzbuditeli gerpanginy u naseleniya Dal'nego Vostoka Rossii. *Byulleten' fiziologii i patologii dyhaniya.* 2025; (97): 57–68. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.36604/1998-5029-2025-97-57-68>. Russian.
8. Sapega EYu, Butakova LV, Trocenko OE. Osobennosti epidemicheskogo processa enterovirusnoj infekcii v Irkutskoj oblasti v 2023 godu. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya — ZNIISO.* 2024; 32 (8): 77–84. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2024-32-8-77-84>. Russian.
9. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006; 44 (8): 2698–704. DOI: 10.1128/JCM.00542-06.
10. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011; 51 (2): 121–5. DOI: 10.1016/j.jcv.2011.03.006.

11. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215 (3): 403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
12. MedCalc Software Ltd. Fisher exact probability. Available from: <https://www.medcalc.org/en/calc/fisher.php> (Version 23.4.5; accessed December 12, 2025).
13. Gaunt E, Harvala H, Österback R, Sreenu VB, Thomson E, Waris M, Simmonds P. Genetic characterization of human coxsackievirus A6 variants associated with atypical hand, foot and mouth disease: a potential role of recombination in emergence and pathogenicity. *J Gen Virol.* 2015; 96 (5): 1067–79. DOI: 10.1099/vir.0.000062.
14. Puenpa J, Vongpunsawad S, Österback R, Waris M, Eriksson E, Albert J, et al. Molecular epidemiology and the evolution of human coxsackievirus A6. *J Gen Virol.* 2016; 97 (12): 3225–31. DOI: 10.1099/jgv.0.000619.
15. Li X, Chen S, Chen Y, Han S, Dai B, Li T, et al. Epidemiological and genetic characterizations of hand, foot, and mouth disease and acute respiratory infections due to CV-A6 infection in Henan Province, China between 2021 and 2022. *BMC Pediatr.* 2025; 25 (1): 264. DOI: 10.1186/s12887-025-05527-6.
16. Justino MCA, da S Mesquita D, Souza MF, Farias FP, Dos S Alves JC, Ferreira JL, et al. Atypical hand-foot-mouth disease in Belém, Amazon region, Northern Brazil, with detection of coxsackievirus A6. *J Clin Virol.* 2020; 126: 104307. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104307.
17. Anh NT, Nhu LNT, Van HMT, Hong NTT, Thanh TT, Hang VTT, et al. Emerging coxsackievirus A6 causing hand, foot and mouth disease, Vietnam. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24 (4): 654–62. DOI: 10.3201/eid2404.171298.
18. Mirand A, Cohen R, Bisseux M, Tomba S, Sellem FC, Gelbert N, et al. A large-scale outbreak of hand, foot and mouth disease, France, as at 28 September 2021. *Euro Surveill.* 2021; 26 (43): 2100978. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.43.2100978.
19. Hu L, Maimaiti H, Zhou L, Gao J, Lu Y. Changing serotypes of hand, foot and mouth disease in Shanghai, 2017–2019. *Gut Pathog.* 2022; 14 (1): 12. DOI: 10.1186/s13099-022-00485-1.
20. Xu S, Li H, Qiao P, Xu G, Zhao D, Lin X, et al. Neonatal hand, foot, and mouth disease due to coxsackievirus A6 in Shanghai. *BMC Pediatr.* 2020; 20 (1): 364.
21. Zhu P, Ji W, Li D, Li Z, Chen Y, Dai B, et al. Current status of hand-foot-and-mouth disease. *J Biomed Sci.* 2023; 30 (1): 15. DOI: 10.1186/s12929-023-00908-4.
22. Chen L, Yao XJ, Yang H, Zhang HL, Shi XL, Peng B, et al. Molecular Epidemiology of Coxsackievirus A10 Associated With Hand, Foot and Mouth Disease From 2021 to 2024 in Shenzhen, China. *J Med Virol.* 2025; 97 (8): e70552. DOI: 10.1002/jmv.70552.
23. Lv S, Zhou Y, Ji J, Yan Y, Zhu G. Epidemiological and genetic characteristics of enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease in Jiaxing, China from 2019 to 2022. *Sci Rep.* 2025; 15 (1): 14546. DOI: 10.1038/s41598-025-99251-x.
24. Kokoreva SP, Kazarceva NV. Izmneneniya mochevoj sistemy u detej pri enterovirusnoj infekcii. *Rossijskij pediatričeskij žurnal.* 2021; 24 (3): 193–6. Dostupno po sssylke: <https://doi.org/10.46563/1560-9561-2021-24-3-193-196>. Russian.
25. Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, Kaiser L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infect Genet Evol.* 2013; 14: 282–93. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.10.016.
26. Apostol LN, Suzuki A, Bautista A, Galang H, Paladin FJ, Fujii N, et al. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the Philippines. *J Med Virol.* 2012; 84 (4): 624–31. DOI: 10.1002/jmv.23242.
27. Holm-Hansen CC, Midgley SE, Fischer TK. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16 (5): e64–75. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00543-5.
28. Coramusi C, Rizzoli A, Alegiani C, Bonafoni S, Auriti C, Parisi P, et al. Neonatal Meningitis Due to Herpes Simplex Virus Type 1 and Enterovirus Coinfection: Case Report and Review of the Literature. *Viruses.* 2025; 17 (6): 790. DOI: 10.3390/v17060790.
29. Nakata K, Kashiwagi M, Masuda M, Shigehara S, Oba C, Murata S, et al. A child with acute encephalopathy associated with quadruple viral infection. *Front Pediatr.* 2015; 3: 26. DOI: 10.3389/fped.2015.00026.
30. Aguado I, Calvo C, Wilhelmi I, Pablo-Hernando ME, Medina MJ, Sáez-Nieto JA, et al. Sepsis and meningitis caused by *Pasteurella multocida* and echovirus 9 in a neonate. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33 (12): 1308–9. DOI: 10.1097/INF.0000000000000504.
31. Ndiaye N, Teixeira DD, Dia N, Da Silva Leite CC, Fall G, Furtado UD, et al. An outbreak of atypical hand, foot and mouth disease associated Coxsackievirus A6 in children from Cape Verde, 2023. *Virol J.* 2025; 22 (1): 48. DOI: 10.1186/s12985-025-02621-0.
32. Hooi PS, Chua BH, Lee CS, Lam SK, Chua KB. Hand, foot and mouth disease: University Malaya Medical Centre experience. *Med J Malaysia.* 2002; 57 (1): 88–91. PMID: 14569726.
33. Calvo C, Gallardo P, Torija P, et al. Enterovirus neurological disease and bacterial coinfection in very young infants with fever. *J Clin Virol.* 2016; 85: 37–39. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.10.020.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ ТЕТРАПЕПТИДОВ HAEE-CY5 И EEAH-CY5 С АГРЕГАТАМИ Aβ НА КЛЕТКАХ SH-SY5Y

А. В. Иванова^{1,2}✉, Н. С. Чмелюк^{1,2}, И. А. Кузьмичев¹, М. И. Шилияева¹, М. А. Абакумов^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт трансляционной медицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

² Институт биомедицинской инженерии, Университет науки и технологий МИСИС, Москва, Россия

В связи с высокой диагностической значимостью β-амилоидных агрегатов при болезни Альцгеймера особый интерес представляют целевые лиганды, способные к специфическому связыванию с патологическими агрегатами Aβ. Целью исследования было провести методом конфокальной микроскопии сравнительную характеристику связывающей способности тетрапептидов HAEE-Cy5 (Ac-His-Ala-Glu-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH₂) и EEAH-Cy5 (Ac-Glu-Glu-Ala-His-Gly-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH₂) с агрегатами Aβ на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y. Показано, что тетрапептид HAEE-Cy5 демонстрирует специфическое связывание с образованием характерных цитоплазматических скоплений и четкой колокализации с амилоидными агрегатами, в то время как пептид EEAH-Cy5 с обращенной последовательностью полностью утрачивает способность к связыванию. Количественный анализ подтвердил высокую специфичность связывания HAEE-Cy5 с агрегатами Aβ (коэффициент колокализации Мандерса 0.58 ± 0.03). Установлено, что N-концевое положение гистидина является критическим детерминантом специфичности взаимодействия. Результаты работы открывают перспективы применения пептида HAEE в качестве платформы для разработки целевых диагностических систем визуализации амилоидной патологии.

Ключевые слова: пептид HAEE, пептид EEAH, агрегаты Aβ, SH-SY5Y, болезнь Альцгеймера

Финансирование: работы выполнены в рамках Государственного задания «Создание радиофармацевтического лекарственного препарата для диагностики болезни Альцгеймера с использованием тетрапептида HAEE в качестве векторной молекулы», регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 1024110600012-8-3.2.25;3.2.26;3.2.12.

Вклад авторов: А. В. Иванова — обзор литературы, подготовка рукописи; Н. С. Чмелюк — фиксация, подготовка клеточных образцов для съемки на микроскопе, получение и анализ изображений на конфокальном микроскопе; И. А. Кузьмичев — синтез флуоресцентных пептидов Ac-HAEEGGGK(ε-Cy5)-NH₂ и Ac-EEAHGGGK(ε-Cy5)-NH₂; М. И. Шилияева — подготовка образцов клеток; М. А. Абакумов — постановка цели, разработка дизайна исследования, подготовка рукописи; все авторы внесли равнозначный вклад в подготовку публикации, подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Валерьевна Иванова
ул. Островитянова, д. 1, стр.1, г. Москва, 117513, Россия; super.fosforit@yandex.ru

Статья получена: 15.10.2025 **Статья принята к печати:** 13.11.2025 **Опубликована онлайн:** 24.11.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.061

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 IMAGING OF THE HAEE-CY5 AND EEAH-CY5 TETRAPEPTIDE BINDING TO THE Aβ AGGREGATES ON THE SH-SY5Y CELLS

Ivanova AV^{1,2}✉, Chmelyuk NS^{1,2}, Kuzmichev IA¹, Shilyaeva MI¹, Abakumov MA^{1,2}

¹ Research Institute of Translational Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Engineering, MISIS University of Science and Technology, Moscow, Russia

Due to high diagnostic value of β-amyloid aggregates, the target ligands capable of specific binding to abnormal Aβ aggregates are of special interest. The study aimed to perform comparative characterization of the HAEE-Cy5 (Ac-His-Ala-Glu-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH₂) and EEAH-Cy5 (Ac-Glu-Glu-Ala-His-Gly-Gly-Gly-Lys(ε-Cy5)-NH₂) tetrapeptide capability of binding to the Aβ aggregates in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line by confocal microscopy. It has been shown that the HAEE-Cy5 tetrapeptide demonstrates specific binding yielding typical cytoplasmic clusters and clear co-localization with the amyloid aggregates, while the EEAH-Cy5 peptide with the inverted sequence totally loses the binding capability. Quantification has confirmed high specificity of the HAEE-Cy5 binding to the Aβ aggregates (Manders' colocalization coefficient 0.58 ± 0.03). It has been found that the histidine N-terminal position is a critical determinant of the interaction specificity. The findings offer the prospects of using the HAEE peptide as a platform for the development of targeted diagnostic systems for amyloid disorder imaging.

Keywords: HAEE peptide, EEAH peptide, Aβ aggregates, SH-SY5Y, Alzheimer's disease

Funding: the work was carried out under the State Assignment "Development of a radiopharmaceutical for the diagnosis of Alzheimer's disease using the HAEE tetrapeptide as a vector molecule", EGISU R&D registration number 1024110600012-8-3.2.25;3.2.26;3.2.12.

Author contribution: Ivanova AV — literature review, manuscript writing; Chmelyuk NS — fixation, cell sample preparation for microscopic imaging, image acquisition and analysis using a confocal microscope; Kuzmichev IA — synthesis of Ac-HAEEGGGK(ε-Cy5)-NH₂ and Ac-EEAHGGGK(ε-Cy5)-NH₂ fluorescent peptides; Shilyaeva MI — cell sample preparation; Abakumov MA — goal setting, developing the study design, manuscript writing; all the authors contributed to preparation of the paper equally, they confirmed compliance of their authorship with the international ICMJE criteria.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna V. Ivanova
Ostrovityanova, 1, str.1, Moscow, 117513, Russia; super.fosforit@yandex.ru

Received: 15.10.2025 **Accepted:** 13.11.2025 **Published online:** 24.11.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.061

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

Болезнь Альцгеймера (БА) — наиболее распространенная в мире нейродегенеративная патология, которая обычно приводит к гибели нейронов и атрофии головного мозга, сопровождается накоплением патологических отложений: сенильных бляшек, состоящих из агрегированного β -амилоида (A β) и нейрофибриллярных клубков, образованных гиперфосфорилированным тау-белком [1, 2]. Несмотря на многолетние исследования, амилоидная гипотеза остается одной из центральных в объяснении патогенеза БА. Накопление олигомерных форм A β и их последующая агрегация в зрелые, стабильные фибриллы считаются ключевым событием, запускающим каскад нейротоксичности и нейровоспаления [3–5], поскольку агрегаты A β являются основным структурным компонентом сенильных бляшек, что делает их приоритетной мишенью для разработки методов диагностики и терапии. Одним из перспективных подходов является поиск соединений, способных ингибировать агрегацию A β . В настоящее время разрабатывают различные классы таких соединений, включая малые молекулы [6, 7], моноклональные антитела (адуканумаб, леканемаб) [8, 9], пептиды [10], природные лиганды [11], многофункциональные гибридные молекулы [12], однако многие из них сталкиваются с проблемами низкой биодоступности, ограниченной эффективности на поздних стадиях БА или серьезными побочными эффектами, такими как ARIA (аномалии визуализации, связанные с амилоидом) в случае антителной терапии [13, 14]. В этом контексте особый интерес представляют короткие пептиды, сочетающие целенаправленное действие с потенциально лучшей проникающей способностью. Таким соединением-кандидатом является тетрапептид HAEE. По некоторым данным [15], HAEE действует как специфический молекулярный инструмент, избирательно связывающийся с металлсвязывающим доменом пептида A β (11EVNH14), формируя в присутствии Zn²⁺ стабильный комплекс. Это взаимодействие, подтвержденное методами поверхностного плазмонного резонанса, ядерного магнитного резонанса и молекулярного моделирования, значительно нарушает Zn²⁺-зависимую димеризацию мономеров A β , тем самым препятствуя образованию токсичных олигомеров. Важным подтверждением эффективности HAEE стали эксперименты *in vivo* на гематоэнцефалическом барьере (ГЭБ): пептид не только подавлял Zn²⁺-индуцированное накопление амилоида, но и полностью предотвращал связанные с ним патологические фенотипы, включая паралич и сокращение продолжительности жизни трансгенных нематод [15]. В данных экспериментах не было зафиксировано признаков токсичности пептида, что указывает на его благоприятный профиль безопасности на этой модельной системе. Кроме того, для HAEE было показано еще одно ключевое свойство: фармакокинетические исследования и молекулярное моделирование указывают на его способность преодолевать ГЭБ [15]. Следует отметить, что HAEE представляет собой пептид, происходящий из последовательности α 4-субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR α 4) [16]. Таким образом, HAEE обладает свойствами уникального кандидата для терапии БА: он имеет установленный механизм действия, направленный на ключевое звено патогенеза, и демонстрирует эффективность на уровне целого организма. Для дальнейшего подтверждения этого механизма простым и наглядным методом может служить прямое обнаружение связывания HAEE с агрегатами A β

в условиях клеточных культур. Для решения этой задачи одним из наиболее популярных и доступных методов является флуоресцентная микроскопия, в частности, с применением иммуноцитохимического анализа.

Таким образом, цель данной работы — провести прямую визуализацию и подтверждение связывания флуоресцентного конъюгата HAEE-Cy5 с агрегатами A β на клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y с помощью флуоресцентной микроскопии для оценки его специфичности и перспектив использования пептида HAEE в качестве целевого лиганда для диагностики и терапии БА.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты были выполнены в лаборатории отдела медицинских нанобиотехнологий Научно-исследовательского института трансляционной медицины РНИМУ имени Н. И. Пирогова. Конфокальную микроскопию проводили в лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» Института биоинженерии Университета науки и технологий МИСИС.

В эксперименте исследовали соединения: HAEE-Cy5 (Ac-His-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Lys(ϵ -Cy5)-NH₂, EEAH-Cy5 (Ac-Glu-Glu-Ala-His-Gly-Gly-Gly-Lys(ϵ -Cy5)-NH₂, Cy5-NH₂. Исследуемые пептиды HAEE-Cy5 и EEAH-Cy5 (чистота > 95% по данным ВЭЖХ) были синтезированы и предоставлены лабораторией отдела медицинских нанобиотехнологий НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н. И. Пирогова. Пептиды состоят из тетрапептидной «головки» (HAEE или EEAH), соединенной через линкер из четырех остатков глицина (GGGG) с флуоресцентным красителем Cy5.

Остаток L-лизина (K) в линкере обеспечивает точку конъюгации для красителя. Структурные формулы исследуемых соединений представлены на рис. 1.

Лиофилизированные пептиды растворяли в стерильной деионизованной воде в концентрации 5–10 мМ и хранили аликвоты растворов при –20 °С не более 3 месяцев. Перед внесением пептидов на клетки растворы разводили в среде для культивирования клеток DMEM/F12, не содержащей эмбриональную телячью сыворотку (ФБС), до концентрации 5 мкМ.

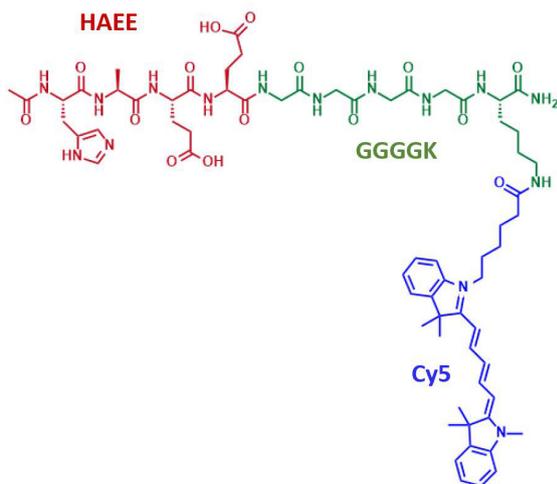
Культивирование клеток линии SH-SY5Y

Клеточную линию нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC, США) выращивали во флаконах для культивирования в среде, состоящей из DMEM/F12 (ServiceBio, Китай) с добавлением 10%-й ФБС («Cytiva (GE Healthcare Life Sciences HyClone)», США), смеси антибиотиков (пенициллин — 100 мкг/мл, стрептомицин — 100 мкг/мл) (ServiceBio, Китай) и L-глутамина (100мМ) (ServiceBio, Китай), при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Препараты бета-амилоида

Лиофилизированный A β (Amyloid β -Protein (1–42) (E-PP-0428), Elabscience, Китай) растворяли в 1% NH₄OH до концентрации 1 мг/мл на ультразвуковой бане без нагрева в течение 10 мин. Далее раствор аликвотировали по 10 мкл и хранили при –80 °С. Перед нанесением на клетки раствор вновь подвергали обработке ультразвуком в течение 30 мин при 37 °С в конечной концентрации (20 мкг/мл).

1



2

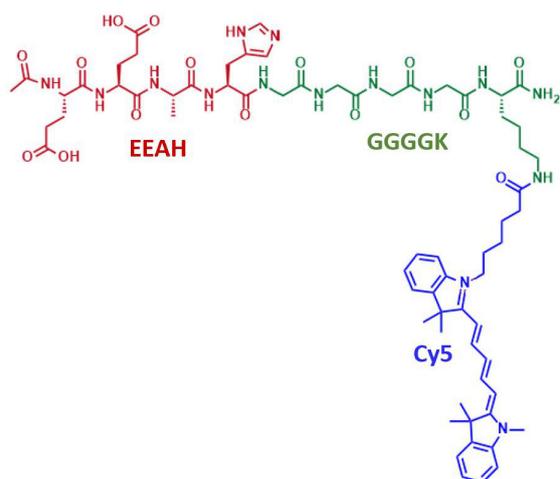


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых конъюгированных пептидов

Иммунофлуоресцентный анализ

Для исследования локализации соединений SH-SY5Y высаживали в лунки 24-луночного планшета по 200×10^3 клеток на лунку. Через 24 ч клетки были обработаны препаратами Аβ (20 мкг/мл) в среде, не содержащей ФБС, и инкубировались 4 ч. После этого клетки дважды отмывали раствором Хенкса и добавляли исследуемые соединения (НАЕЕ-Сy5, ЕЕАН-Сy5, NH₂-Сy5) в концентрации 5 мкМ и инкубировали 2 ч. Затем клетки подвергали фиксации в течение 15 мин в 4%-м параформальдегиде при +4 °С. Пермеабиллизацию проводили в блокирующем буфере 0,2%-го Твин-20, 0,2%-м Тритон X-100 и 2%-й козьей сыворотке в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее проводили инкубацию в течение 60 мин с первичными антителами (антитела мыши IgG1 против человеческого белка бета-амилоида, ab1, clone 6E10 BioLegend) в разведении 1:100 000 (0,01 мкг/мл) в буфере (0,2% Твин-20, 0,2% Тритон X-100, 0,2% козья сыворотка, ФБС). После этого клетки трижды отмывали раствором 0,2%-го Твин-20, 0,2%-го Тритона X-100 по 5 мин. Далее клетки инкубировали со вторичными антителами (ab11, Антитела козы против IgG(H+L), конъюгированные с alexa 488, E-AB-1056, Elabscience, Китай). Инкубация со вторичными антителами также составляла 60 мин, после клетки трижды промывали раствором 0,2%-го Твин-20, 0,2%-го Тритона X-100 по 5 мин и окрашивали ядерным красителем DAPI.

Конфокальная микроскопия

Визуализацию клеток проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Токио, Япония), оснащенного лазерной сканирующей системой (Thorlabs, Ньютон, Нью-Джерси, США) и объективом Аро 60x/0.5-1.25 с масляной иммерсией. Сканирование проводили с помощью программного обеспечения ThorImageLS (версия 2.4) (Thorlabs, Ньютон, Нью-Джерси, США); для обработки изображений использовали программное обеспечение Fiji 2.9.0.

Статистический анализ

Колокализацию изображений в каналах alexa488 и Cy5 рассчитывали, используя программное обеспечение Fiji и

коэффициент Мандерса; для анализа использовали $n = 6$ изображений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для подтверждения специфичности иммунофлуоресцентного окрашивания на клетках линии SH-SY5Y был проведен ряд контрольных экспериментов (рис. 2). При использовании только вторичных антител, конъюгированных флуоресцентной меткой alexa 488 (ab11), значимый флуоресцентный сигнал не детектировался. Аналогично инкубация клеток с Аβ в отсутствие первичных антител (ab1) не приводила к появлению специфического окрашивания. Обработка клеток только ab1 или ab11 без Аβ не вызвала значимого флуоресцентного сигнала. Интенсивное флуоресцентное окрашивание наблюдали исключительно при одновременном присутствии Аβ, ab1 и ab11 и соответствовало ожидаемой локализации целевых антигенов. Полученные результаты подтверждают, что специфическое окрашивание требует наличия всех компонентов системы и доказывают специфичность использованных антител.

Далее была исследована локализация НАЕЕ-Сy5 и ЕЕАН-Сy5 на клетках. В ходе контрольного эксперимента с использованием свободного красителя Сy5-NH₂ выявлена его неспецифическая интернализация, проявляющаяся в виде диффузного сигнала на мембране и в цитоплазме клеток. Частичную локализацию столь гидрофобного соединения в цитоплазме можно объяснить пермеабиллизацией клеток при проведении анализа. Напротив, для соединений ЕЕАН-Сy5 и НАЕЕ-Сy5 наблюдали интенсивный и структурно организованный сигнал, качественно отличающийся от контроля: он характеризовался выраженным мембраносвязанным компонентом и формированием дискретных скоплений в цитоплазме (рис. 3). Это свидетельствует о специфическом взаимодействии исследуемых соединений с клеточными структурами, которое не сводится к неспецифическому накоплению красителя.

В связи с обнаруженной специфической локализацией ЕЕАН-Сy5 и НАЕЕ-Сy5 была непосредственно проверена их способность к связыванию с агрегатами Аβ. Анализ конфокальных микрофотографий продемонстрировал четкую и интенсивную колокализацию сигнала НАЕЕ-Сy5 (красный) с сигналом от отложений Аβ (alexha 488, зеленый),

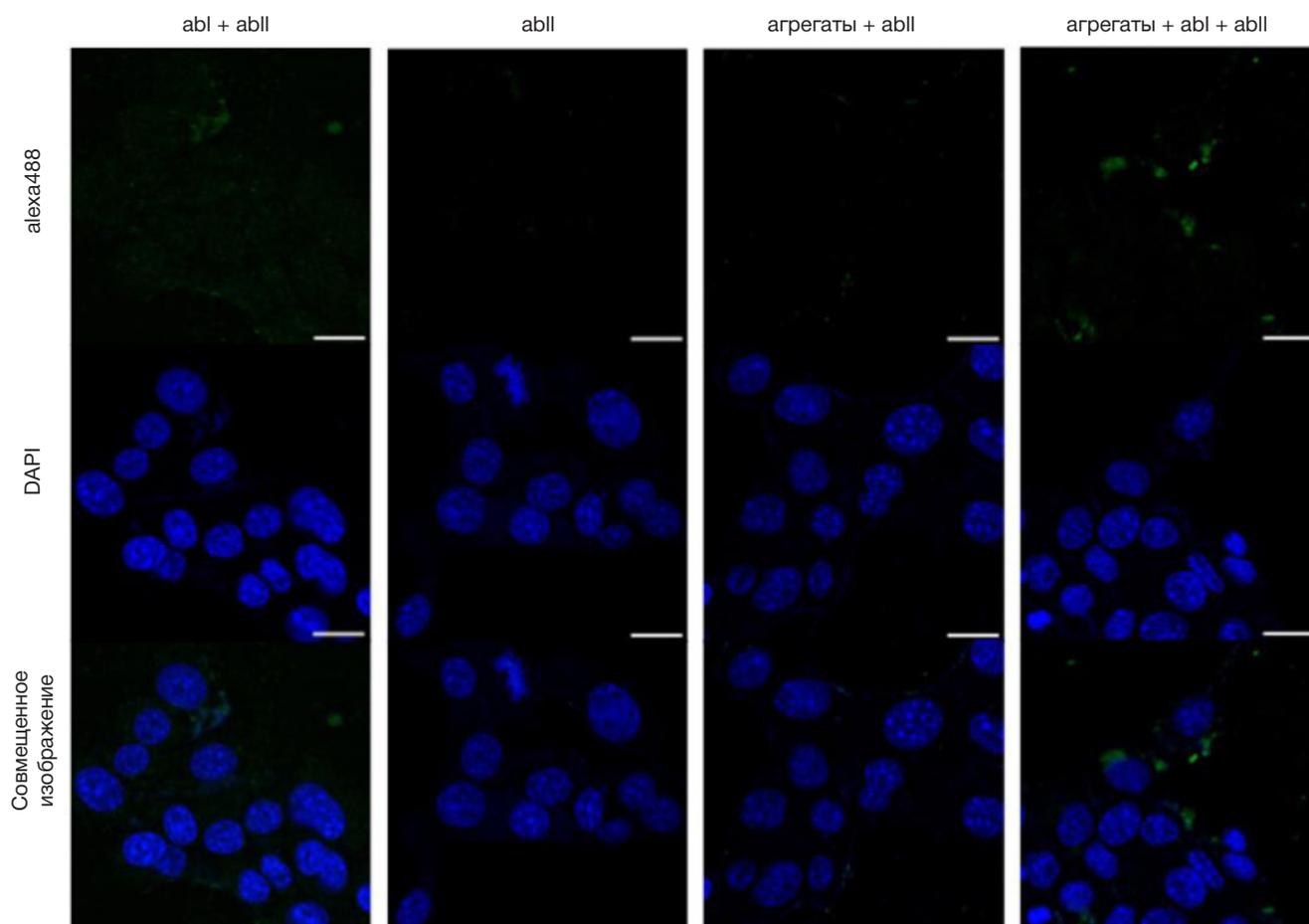


Рис. 2. Контроль специфичности иммунофлуоресцентного окрашивания в клетках линии SH-SY5Y. Совмещение каналов демонстрирует локализацию целевых антигенов, меченных alexa 488 (зеленый) на агрегатах Аβ. Ядра клеток визуализированы с помощью DAPI (синий). Масштабный отрезок 20 мкм

визуализируемую в виде обширных желтых областей на совмещенном изображении (рис. 4), что однозначно указывает на высокоаффинное связывание тетрапептида НАЕЕ-Су5 с амилоидными агрегатами. В отличие от НАЕЕ-Су5, для пептида ЕЕАН-Су5 не было зафиксировано значимого сигнала в канале Су5, что свидетельствует о его неспособности к специфическому взаимодействию с изучаемой мишенью. Исходный краситель Су5 хоть и проявлял некоторую возможность связывания с амилоидными отложениями, в большей степени был локализован неспецифически, что также подтверждает высокое сродство НАЕЕ-Су5 к белковым агрегатам Аβ. Для дополнительного подтверждения колокализации каналов был рассчитан коэффициент Мандерса между каналами изображений агрегатов Аβ и исследуемыми соединениями для полученных изображений: наиболее высоким значение коэффициента оказалось для соединения НАЕЕ-Су5 и агрегатов Аβ (0.58 ± 0.03), в то время как между каналами Аβ и Су5 и каналами Аβ и ЕЕАН-Су5 значения составляли 0.22 ± 0.05 и 0.19 ± 0.02 соответственно, что говорит об отсутствии колокализации Су5 и ЕЕАН-Су5 и гораздо более высокой степени связывания НАЕЕ-Су5 с Аβ. Крайне невысокий сигнал флуоресценции от ЕЕАН-Су5 может быть связан с его низкой способностью удерживаться на агрегатах Аβ и на других компартаментах клетки. В то же время сигнал от Су5 является значительным и усиливается в областях агрегатов Аβ, однако значительная часть флуоресценции распределена в области мембраны и цитоплазмы, что говорит о низкой специфичности связывания Су5 с Аβ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование позволило выявить фундаментальные различия в способности НАЕЕ-Су5 и ЕЕАН-Су5 к связыванию с агрегатами Аβ на клеточной линии SH-SY5Y, что, по-видимому, обусловлено их структурными особенностями. Несмотря на идентичный аминокислотный состав, обращенная последовательность ЕЕАН-Су5 привела к полной потере функциональной активности, в то время как НАЕЕ-Су5 продемонстрировал высокую специфичность к исследуемой мишени. Полученные данные позволяют предположить, что N-концевое положение гистидина в последовательности НАЕЕ-Су5 является критическим для формирования специфических взаимодействий с Аβ. Наши данные однозначно демонстрируют, что перенос гистидина (His, H) с первой на четвертую позицию в тетрапептидной «головке» лиганда приводит к резкому снижению способности к связыванию с Аβ. Известно, что N-концевой домен пептида Аβ содержит основные центры для связывания, а именно остатки His6, His13, His14, которые являются хорошими σ-донорами и участвуют в координации с металлами [17], а также ароматические остатки Phe4 и Tyr10, ответственные за π-π взаимодействия [17, 18]. Можно предположить, что гистидин в составе НАЕЕ участвует в аналогичных взаимодействиях с этими сайтами. В случае неактивного пептида ЕЕАН присутствие двух отрицательно заряженных остатков глутаминовой кислоты (Glu, E) в N-концевой позиции, а также присутствие флуоресцентного красителя Су5 на ε-конце лизина (Lys, K) могут вызывать

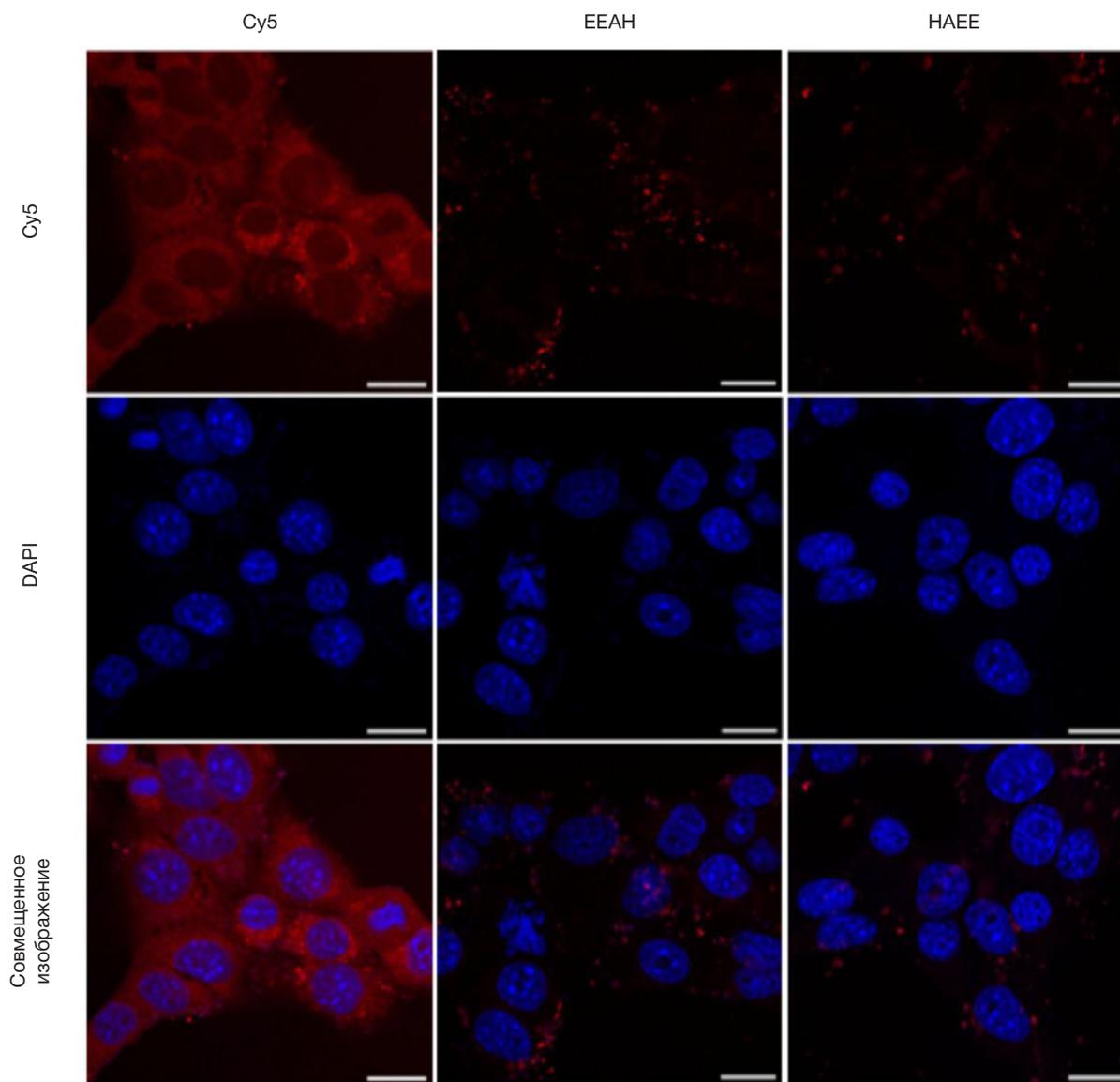


Рис. 3. Локализация соединений EEAN-Cy5 и HAEE-Cy5 в клетках линии SH-SY5Y. Сигнал от соединений, меченных Cy5 (красный). Ядра клеток визуализированы с помощью DAPI (синий). Масштабный отрезок 20 мкм

сворачивание пептидной цепи или создавать стерические препятствия, нарушающие пространственную ориентацию и доступность ключевого остатка гистидина. В такой конфигурации гистидин может быть стерически недоступен для взаимодействия с сайтами связывания на A β .

Количественным подтверждением высокой специфичности связывания HAEE-Cy5 с амилоидными агрегатами служит расчет коэффициента колокализации Мандерса. Значение коэффициента 0.58 ± 0.03 для пары HAEE-Cy5 / A β существенно превышает значения для контрольных соединений (Cy5-NH₂ / A β и EEAN-Cy5 / A β), которые были близки к нулю. Этот количественный анализ убедительно свидетельствует, что интенсивный сигнал колокализации не является случайным и подтверждает высокое сродство пептида HAEE именно к целевым A β -агрегатам, что полностью согласуется с визуальными наблюдениями и демонстрирует критическую важность правильной последовательности аминокислот для эффективного взаимодействия.

Отсутствие флуоресцентного сигнала от EEAN-Cy5 при четкой детекции связывания HAEE-Cy5 с внеклеточными агрегатами A β указывает на его неспособность к

специфическому взаимодействию с мишенью. Это различие, обусловленное неоптимальной первичной структурой контрольного пептида, может быть следствием нескольких факторов: нарушения связывания с A β , повышенной чувствительности к протеолитической деградации, ухудшенной клеточной проницаемости или ускоренного выведения из клетки. Таким образом, в отличие от HAEE-Cy5, пептид EEAN-Cy5 не выполняет целевую функцию, что подтверждает критическую важность конкретной аминокислотной последовательности для эффективного связывания. Стоит отметить, что в отсутствие A β оба пептида демонстрировали схожую внутриклеточную локализацию, что указывает на их стабильность и способность к проникновению в клетку. Однако интенсивный и структурно организованный сигнал от пептида HAEE-Cy5, проявляющийся в виде дискретных цитоплазматических скоплений, указывает на его способность к проникновению в клетку и взаимодействию с внутриклеточными структурами. При этом, согласно литературным данным [19], наблюдаемая колокализация с A β (рис. 4) происходит во внеклеточном пространстве, что и подтверждает специфичность связывания. Важно

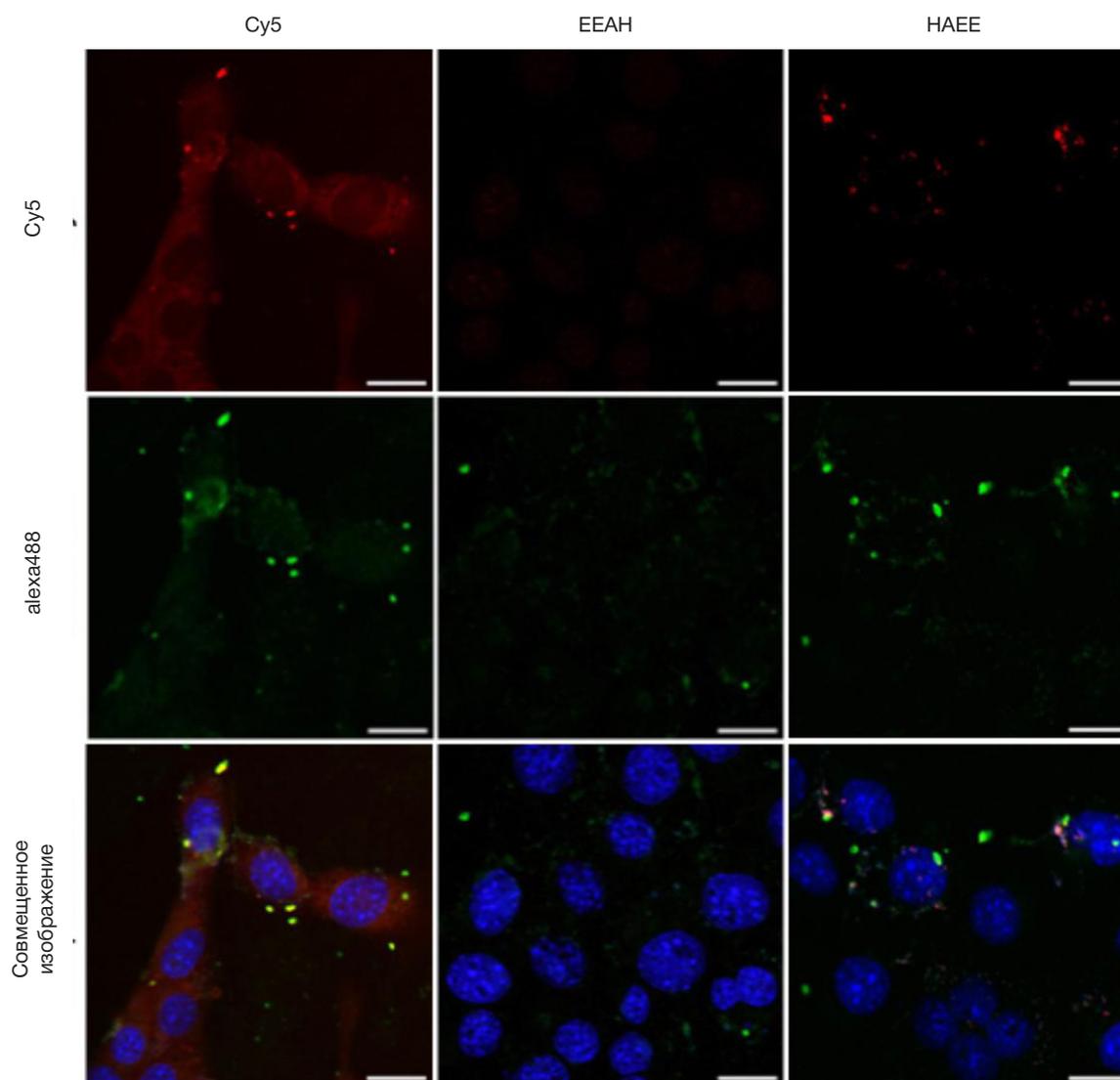


Рис. 4. Визуализация связывания HAEE-Cy5 и EEAH-Cy5 с агрегатами Aβ в клетках линии SH-SY5Y. Сигнал от тетрапептидов, меченных Cy5 (красный). Антитела на Aβ, меченные alexa 488 (зеленый). Желтый цвет на совмещенном изображении указывает на колокализацию пептидов с агрегатами Aβ. Ядра клеток визуализированы с помощью DAPI (синий). Масштабный отрезок 20 мкм

отметить, что наблюдаемое распределение HAEE-Cy5 качественно отличалось от диффузного сигнала свободного красителя Cy5-NH₂, что исключает объяснение простым накоплением красителя и подчеркивает роль пептидной последовательности в направленном связывании.

Полученные результаты имеют важное практическое значение. Выявленная специфичность HAEE-Cy5 к агрегатам Aβ позволяет рассматривать его в качестве перспективного лиганда для создания диагностических средств. В частности, его можно использовать как основу для разработки: МРТ-контрастных препаратов для прижизненной визуализации амилоидных бляшек, флуоресцентных зондов для интраоперационной детекции амилоидных отложений, терапевтических платформ для направленной доставки лекарственных средств. В отличие от HAEE-Cy5, пептид EEAH-Cy5 демонстрирует полное отсутствие связывающей активности, и это наглядно показывает, что биологическая функция определяется не только аминокислотным составом, но и строго определенным порядком аминокислот. Для дальнейшего развития данного направления исследований требуется: 1) детальное изучение молекулярных взаимодействий HAEE с Aβ-методами молекулярного докинга и спектроскопии;

2) оценка способности HAEE ингибировать агрегацию Aβ *in vitro*; 3) исследование *in vivo* распределения и биодоступности HAEE на трансгенных моделях БА. Таким образом, результаты работы не только идентифицировали высокоспецифичный лиганд для Aβ, но и продемонстрировали, что минимальные изменения в структуре пептида могут кардинально влиять на его функциональные свойства, что имеет фундаментальное значение для дизайна пептидных препаратов.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования была успешно валидирована методика детекции агрегатов Aβ и визуализировано специфическое связывание тетрапептида HAEE, конъюгированного с Cy5, с амилоидными агрегатами на клеточной линии SH-SY5Y, что было количественно подтверждено высоким коэффициентом колокализации Мандерса (0.58 ± 0.03). Критическая важность аминокислотной последовательности для этого взаимодействия была установлена на основании того, что пептид EEAH-Cy5 с инвертированной последовательностью продемонстрировал полное отсутствие связывающей активности. Таким образом, установлено, что именно

N-концевое положение гистидина является критическим для формирования специфических взаимодействий с агрегатами Аβ. Полученные результаты подтверждают перспективность применения HAEE в качестве целевого лиганда для разработки диагностических и тераностических средств

против БА, а также подчеркивают важность стереохимических факторов при конструировании пептидных препаратов. Для дальнейшего развития направления требуются исследования молекулярных механизмов взаимодействия и изучение *in vivo* распределения пептида.

Литература

- Kolobova EA, Petrushanko IY, Mitkevich VA, Makarov AA, Grigorova IL. Novel method for detection of Aβ and Iso-D7-Aβ N-terminus-specific B cells and Iso-D7-Aβ-specific antibodies. *Biol Methods Protoc.* 2025; 10 (1).
- Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7 (1): 33.
- Harris JR, Marles-Wright J, editors. *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function.* Subcell Biochem. 2019; 93.
- Walsh DM, Selkoe DJ. Amyloid β-protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2020; 61: 116–24.
- Katzmarski N, Ziegler-Waldkirch S, Scheffler N, Witt C, Abou-Ajram C, Nuscher B, et al. Aβ oligomers trigger and accelerate Aβ seeding. *Brain Pathol.* 2020; 30 (1): 36–45.
- Wilcock GK, Gauthier S, Frisoni GB, Jia J, Harlund JH, Moebius HJ, et al. Potential of low dose leuco-methylthionium bis(hydromethanesulphonate) monotherapy for treatment of mild Alzheimer's disease: cohort analysis as modified primary outcome in a phase III clinical trial. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61 (1): 435–57.
- Paul A, Viswanathan GKK, Huber A, Arad E, Engel H, Jelinek R, et al. Inhibition of tau amyloid formation and disruption of its preformed fibrils by naphthoquinone-dopamine hybrid. *FEBS J.* 2021; 288 (13): 4267–90.
- Fedele E. Anti-amyloid therapies for Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (19): 14499.
- Kepp KP, Robakis NK, Høiland-Carlsen PF, Sensi SL, Vissel B. The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. *Brain.* 2023; 146 (9): 3969–90.
- Tucker M, Liao GY, Park JY, Rosenfeld M, Wezeman J, Mangalindan R, et al. Behavioral and neuropathological features of Alzheimer's disease are attenuated in 5xFAD mice treated with intranasal GHK peptide. *bioRxiv.* 2023; 20: 2023.11.20.567908.
- Kryscio RJ, Abner EL, Caban-Holt A, Lovell M, Goodman P, Darke AK, et al. Association of antioxidant supplement use and dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADViSE). *JAMA Neurol.* 2017; 74 (5): 567–73.
- Ramesh M, Govindaraju T. Multipronged diagnostic and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Chem Sci.* 2022; 13 (46): 13657–89.
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2014; 370 (4): 322–33.
- Ivanova AV, Kutuzova AD, Kuzmichev IA, Abakumov MA. Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to promising therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2025; 26 (19): 9444.
- Mitkevich VA, Barykin EP, Eremina S, Pani B, Katkova-Zhukotskaya O, Polshakov VI, et al. Zn-dependent β-amyloid aggregation and its reversal by the tetrapeptide HAEE. *Aging Dis.* 2023; 14 (2): 309–14.
- Barykin EP, Garifulina AI, Tolstova AP, Anashkina AA, Adzhubei AA, Mezentsev YV, et al. Tetrapeptide Ac-HAEE-NH2 protects α4β2 nAChR from inhibition by Aβ. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (24): 1–18.
- Silva DES, Cali MP, Pazin WM, Carlos-Lima E, Salles Trevisan MT, Venâncio T, et al. Luminescent Ru(II) phenanthroline complexes as a probe for real-time imaging of Aβ self-aggregation and therapeutic applications in Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2016; 59 (19): 9215–27.
- Yao S, Cherny RA, Bush AI, Masters CL, Barnham KJ. Characterizing bathocuproine self-association and subsequent binding to Alzheimer's disease amyloid β-peptide by NMR. *J Pept Sci.* 2004; 10 (4): 210–7.
- Petrushanko IY, Mitkevich VA, Anashkina AA, Adzhubei AA, Burnysheva KM, Lakunina VA, et al. Direct interaction of beta-amyloid with Na, K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci Rep.* 2016; 6: 27738.

References

- Kolobova EA, Petrushanko IY, Mitkevich VA, Makarov AA, Grigorova IL. Novel method for detection of Aβ and Iso-D7-Aβ N-terminus-specific B cells and Iso-D7-Aβ-specific antibodies. *Biol Methods Protoc.* 2025; 10 (1).
- Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2021; 7 (1): 33.
- Harris JR, Marles-Wright J, editors. *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function.* Subcell Biochem. 2019; 93.
- Walsh DM, Selkoe DJ. Amyloid β-protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2020; 61: 116–24.
- Katzmarski N, Ziegler-Waldkirch S, Scheffler N, Witt C, Abou-Ajram C, Nuscher B, et al. Aβ oligomers trigger and accelerate Aβ seeding. *Brain Pathol.* 2020; 30 (1): 36–45.
- Wilcock GK, Gauthier S, Frisoni GB, Jia J, Harlund JH, Moebius HJ, et al. Potential of low dose leuco-methylthionium bis(hydromethanesulphonate) monotherapy for treatment of mild Alzheimer's disease: cohort analysis as modified primary outcome in a phase III clinical trial. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61 (1): 435–57.
- Paul A, Viswanathan GKK, Huber A, Arad E, Engel H, Jelinek R, et al. Inhibition of tau amyloid formation and disruption of its preformed fibrils by naphthoquinone-dopamine hybrid. *FEBS J.* 2021; 288 (13): 4267–90.
- Fedele E. Anti-amyloid therapies for Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (19): 14499.
- Kepp KP, Robakis NK, Høiland-Carlsen PF, Sensi SL, Vissel B. The amyloid cascade hypothesis: an updated critical review. *Brain.* 2023; 146 (9): 3969–90.
- Tucker M, Liao GY, Park JY, Rosenfeld M, Wezeman J, Mangalindan R, et al. Behavioral and neuropathological features of Alzheimer's disease are attenuated in 5xFAD mice treated with intranasal GHK peptide. *bioRxiv.* 2023; 20: 2023.11.20.567908.
- Kryscio RJ, Abner EL, Caban-Holt A, Lovell M, Goodman P, Darke AK, et al. Association of antioxidant supplement use and dementia in the Prevention of Alzheimer's Disease by Vitamin E and Selenium Trial (PREADViSE). *JAMA Neurol.* 2017; 74 (5): 567–73.
- Ramesh M, Govindaraju T. Multipronged diagnostic and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Chem Sci.* 2022; 13 (46): 13657–89.
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2014; 370 (4): 322–33.
- Ivanova AV, Kutuzova AD, Kuzmichev IA, Abakumov MA. Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to promising therapeutic strategies. *Int J Mol Sci.* 2025; 26 (19): 9444.
- Mitkevich VA, Barykin EP, Eremina S, Pani B, Katkova-Zhukotskaya O,

- Polshakov VI, et al. Zn-dependent β -amyloid aggregation and its reversal by the tetrapeptide HAEE. *Aging Dis.* 2023; 14 (2): 309–14.
16. Barykin EP, Garifulina AI, Tolstova AP, Anashkina AA, Adzhubei AA, Mezentsev YV, et al. Tetrapeptide Ac-HAEE-NH₂ protects α 4 β 2 nAChR from inhibition by A β . *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (24): 1–18.
 17. Silva DES, Cali MP, Pazin WM, Carlos-Lima E, Salles Trevisan MT, Venâncio T, et al. Luminescent Ru(II) phenanthroline complexes as a probe for real-time imaging of A β self-aggregation and therapeutic applications in Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 2016; 59 (19): 9215–27.
 18. Yao S, Cherny RA, Bush AI, Masters CL, Barnham KJ. Characterizing bathocuproine self-association and subsequent binding to Alzheimer's disease amyloid β -peptide by NMR. *J Pept Sci.* 2004; 10 (4): 210–7.
 19. Petrushanko IY, Mitkevich VA, Anashkina AA, Adzhubei AA, Burnysheva KM, Lakunina VA, et al. Direct interaction of beta-amyloid with Na, K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci Rep.* 2016; 6: 27738.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МУЛЬТИТАРГЕТНОЙ НЕИНВАЗИВНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ЛОБНО-ТЕМЕННОЙ СЕТИ КОНТРОЛЯ

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

Российский центр неврологии и нейронаук, Москва, Россия

Персонализация выбора мишени для рТМС — актуальная задача, решение которой может значительно увеличить эффективность метода. Один из подходов к персонализации — стимуляция ключевых хабов индивидуальных сетей покоя. Цель исследования — разработка методологии персонализации рТМС на основе выделения индивидуальных хабов фронтально-париетальной контрольной сети (FPCN) с оценкой варибельности их локализации. Для определения хабов FPCN были построены индивидуальные карты с использованием в качестве seed групповой маски сети FPCN. С помощью алгоритма прожектора с радиусом сферы 5 мм были выбраны мишени в пределах дорсолатеральной префронтальной коры (ДЛПФК) и задней теменной коры (ЗТК). Анализировали варибельность пространственной локализации мишеней и корректность применения рутинного «правила 5 см» для локализации ДЛПФК. У 24 здоровых добровольцев (9 мужчин, средний возраст 29±7 лет) продемонстрирована высокая межличностная варибельность мишеней. Ни в одной из областей не существует универсального положения стимулирующей катушки, позволившего бы эффективно стимулировать мишени у всех добровольцев. Пространственный разброс точек выше в ДЛПФК (объемы многогранников, содержащих множества точек равны 2095 мм³ в ДЛПФК и 739 мм³ в ЗТК). Все индивидуальные мишени в ДЛПФК лежат в пределах маски FPCN, а для ЗТК ряд мишеней находится вне этой маски. Среднее расстояние между зоной кисти первичной моторной коры (M1) и ДЛПФК составило 64±13 мм. У 75% участников это расстояние превышало 5 см, что подтверждает некорректность применения рутинного «правила 5 см» позиционирования катушки для большинства испытуемых. Разработан алгоритм выбора персонализированных мишеней для рТМС по данным фМРТ покоя в ДЛПФК и ЗТК, которые являются ключевыми хабами FPCN.

Ключевые слова: мультитаргетная транскраниальная магнитная стимуляция, персонализация, сети покоя, лобно-теменная сеть контроля

Финансирование: исследование выполнено в рамках проекта «Разработка методики транскраниальной магнитной стимуляции для улучшения когнитивных функций у здоровых лиц», выполняемого в ходе Национального проекта «Новые технологии сохранения здоровья» (рег. №1025020400006-8-3.2.25).

Вклад авторов: А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын, И. С. Бакулин — планирование и дизайн исследования; А. Г. Пойдашева, А. Х. Забирова — анализ литературы; И. С. Бакулин, А. Х. Забирова, Д. Ю. Лагода — сбор данных; Д. О. Синицын, А. Г. Пойдашева — анализ данных; А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын — подготовка статьи; все авторы — интерпретация данных, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ РЦНН (протокол № 5-1/25 от 19 мая 2025 г.). Все добровольцы подписали форму добровольного информированного согласия.

 **Для корреспонденции:** Александра Георгиевна Пойдашева
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367, Россия; poydasheva@neurology.ru

Статья получена: 14.11.2025 **Статья принята к печати:** 10.12.2025 **Опубликована онлайн:** 20.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.081

DETERMINING TARGETS FOR PERSONALIZED MULTITARGET NONINVASIVE STIMULATION OF THE FRONTOPARIETAL CONTROL NETWORK

Poydasheva AG , Sinitsyn DO, Bakulin IS, Zaborova AH, Lagoda DYu, Suponeva NA, Piradov MA

Russian Center of Neurology and Neurosciences, Moscow, Russia

Personalization of selecting a target for rTMS is a problem, solving which can significantly increase the method efficacy. Stimulation of the key hubs of individual-level resting-state networks represents an approach to personalization. The study aimed to develop an rTMS personalization method based on the selection of individual frontoparietal control network (FPCN) hubs and assessment of their localization variability. To determine the FPCN hubs, individual maps were built using the FPCN group mask as a seed. The searchlight algorithm with the sphere radius of 5 mm was used to select targets within the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) and posterior parietal cortex (PPC). The target spatial localization variability and correctness of using the routine “5 cm rule” for the DLPFC localization were analyzed. In 24 healthy volunteers (9 males, average age 29±7 years), high interindividual variability of targets was demonstrated. In no area is there a universal position of the stimulation coil that would effectively stimulate targets in all volunteers. Spatial dispersion of points is higher in the DLPFC (volumes of the polyhedra containing the point sets are 2095 mm³ in the DLPFC and 739 mm³ in the PPC). All individual targets in the DLPFC are located within the FPCN mask, while in the PPC some targets are outside this mask. The average distance between the M1 zones and DLPFC is 64±13 mm. In 75% of the subjects, this exceeds 5 cm, which confirms that it was incorrect to use the routine “5 cm rule” for coil positioning in the majority of subjects. An algorithm to select personalized targets for rTMS based on the resting-state fMRI data in the DLPFC and PPC being the key FPCN hubs has been developed.

Keywords: multitarget transcranial magnetic stimulation, personalization, resting-state networks, frontoparietal control network

Funding: the study was conducted as part of the project “Developing a Transcranial Magnetic Stimulation Method to Improve Cognitive Functions in Healthy Individuals” implemented within the framework of the National Project “New Health Preservation Technologies” (registration number 1025020400006-8-3.2.25).

Author contribution: Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Bakulin IS — study planning and design; Poydasheva AG, Zaborova AH — literature review; Bakulin IS, Zaborova AH, Lagoda DYu — data acquisition; Sinitsyn DO, Poydasheva AG — data analysis; Poydasheva AG, Sinitsyn DO — manuscript writing; all authors — data interpretation, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Russian Center of Neurology and Neurosciences (protocol No. 5-1/25 dated 19 May 2025). All the volunteers signed the informed consent form.

 **Correspondence should be addressed:** Alexandra G. Poydasheva
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125310, Russia; poydasheva@neurology.ru

Received: 14.11.2025 **Accepted:** 10.12.2025 **Published online:** 20.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.081

Ритмическая транскраниальная магнитная стимуляция (рТМС) — один из методов неинвазивной нейромодуляции, широко используемый в исследовательской и клинической практике [1]. Протоколы рТМС оказывают долговременные эффекты, схожие с механизмами синаптической пластичности: высокочастотные протоколы и стимуляция интермиттирующими тета-вспышками оказывают эффект, подобный долговременной потенциации (LTP-like), увеличивая возбудимость стимулируемой зоны коры, в то время как низкочастотные протоколы и стимуляция постоянными тета-вспышками — эффект, подобный долговременной депрессии (LTD-like), уменьшая возбудимость стимулируемой зоны [2]. В последние годы широко обсуждаются нейросетевые эффекты рТМС, состоящие в возможности модулировать не только активность стимулируемой зоны, но и отдаленных регионов мозга, имеющих структурные или функциональные связи с этой зоной [3, 4].

Важной проблемой применения рТМС как в клинике, так и в исследовательской практике является высокая вариабельность эффектов, одной из возможных причин которой считается неоптимальный выбор мишени для стимуляции. Размер большинства стимулируемых анатомических областей превышает размер фокуса магнитного поля, генерируемого стимулирующей катушкой, что приводит к большому числу возможных вариантов позиционирования катушки в рамках данной области. Кроме того, различные зоны в пределах этих анатомических областей могут иметь разную цитоархитектонику, а также структурную и функциональную связность, что особенно важно в контексте нейросетевых эффектов рТМС [5, 6].

Появление нейронавигационных систем ТМС и алгоритмов расчета максимума ТМС-индуцированного электрического поля позволило в режиме реального времени контролировать положение стимулирующей катушки относительно индивидуальных структурных данных МРТ испытуемого, а также значительно увеличить точность ее позиционирования [7]. Кроме того, нейронавигационные системы позволили использовать для нацеливания данные функциональной МРТ (как групповые, так и индивидуальные), что открыло новые возможности для персонализированного определения и воздействия на выбранные мишени [8]. Исследуются различные подходы к персонализированному определению мишеней на основе функциональной МРТ покоя и с различными парадигмами. Одним из подходов является персонализированное определение локализации «хабов» той или иной сети покоя. Основная гипотеза в данном случае состоит в возможности оказания нейросетевых эффектов ТМС и модуляции активности конкретной сети при стимуляции одного или нескольких ее «хабов».

Существует ряд методологических вопросов, связанных как с индивидуальным выделением сетей покоя, так и с определением самой мишени, исходя из выявляемых карт активации. Например, для выделения индивидуальных сетей покоя предложено несколько алгоритмов: итеративный (см. подробнее [9]), алгоритм Infomap [10], многосессионная иерархическая байесовская модель (multi-session hierarchical Bayesian model, MS-HBM) [11], метод независимых компонент (ICA) и др. В качестве мишени в пределах выделенных карт связности может быть задана точка, сигнал которой имеет максимальное значение интересующей характеристики функциональной связности [12], или использован ряд подходов, учитывающих связность зоны вокруг этой точки. Например, алгоритм прожектора

(«searchlight») выделяет точку с максимальным средним от интересующей характеристики функциональной связности по сфере заданного радиуса с центром в этой точке [13], а кластерный алгоритм с помощью заданного порога отсекает кластер с максимальным сигналом и использует координаты центра масс этого кластера [14].

Лобно-теменная сеть контроля (frontoparietal control network, FPCN) — одна из наиболее стабильно выделяемых на фМРТ покоя сетей, активность которой связана с когнитивной деятельностью [15, 16]. Основными хабами FPCN, расположенными поверхностно и доступными для рТМС, являются дорсолатеральная префронтальная кора (ДЛПФК) и задняя теменная кора (ЗТК). В исследованиях продемонстрирована возможность модуляции когнитивных функций в популяции здоровых испытуемых и пациентов при рТМС этих регионов без применения персонализированного подхода, однако результаты этих исследований гетерогенны вследствие высокой вариабельности эффектов [17–19].

Задачей настоящего исследования стала разработка методологии персонализированного определения мишеней для транскраниальной магнитной стимуляции на основе выделения индивидуальных хабов FPCN в пределах ДЛПФК и ЗТК с оценкой вариабельности локализации таких мишеней у здоровых добровольцев.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе ФГБНУ «Российский центр неврологии и нейронаук» в 2025 г. Для всех здоровых добровольцев собирали медицинский анамнез и демографические данные.

Участники исследования

Критерии включения: наличие добровольного информированного согласия; возраст — 20–50 лет. Критерии исключения: отказ от участия в исследовании; противопоказания к проведению МРТ; наличие неврологических заболеваний, влияющих на когнитивные функции, или психических заболеваний на момент включения в исследование или в анамнезе; наличие хронических тяжелых соматических заболеваний, декомпенсации хронической патологии или заболевания в острой фазе (например, ОРВИ).

В исследование были включены 24 здоровых добровольца в возрасте 21–48 лет (9 мужчин, средний возраст составил 29 лет, стандартное отклонение — 7 лет).

Всем добровольцам на магнитно-резонансном томографе Siemens MAGNETOM Prisma (Германия) с величиной магнитной индукции 3 Тл проводили нейровизуализационное обследование.

Получение и предобработка данных МРТ

Протокол нейровизуализационного исследования включал режим T1-взвешенных изображений с возможностью реконструкции изображений в любых проекциях (MPR) для получения структурных данных (TR 2300 мс, воксел $1 \times 1 \times 1$ мм³) и режим «мультипланарное градиентное эхо» (TR 1500 мс, воксел $2 \times 2 \times 2,2$ мм³) для записи сигнала фМРТ покоя с целью анализа функциональной связности.

Анализ данных МРТ проводили с использованием программных пакетов CONN (Functional Connectivity SPM

Toolbox 2017, McGovern Institute for Brain Research, Massachusetts Institute of Technology (<http://www.nitrc.org/projects/conn>), Кембридж, США) версии 22.v2407 и SPM12 (Functional Imaging Laboratory, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, Institute of Neurology (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software>), Лондон, Великобритания). Для функциональных изображений производили выравнивание с коррекцией искажений восприимчивости с использованием карт поля, коррекцию времени срезов, обнаружение выбросов. Структурные данные были сегментированы на ткани и нормализованы в пространство MNI (Montreal Neurological Institute), а функциональные данные нормализованы с помощью поля деформации, вычисленного для структурных данных (непрямая нормализация). Для функциональных данных производилось также пространственное сглаживание с гауссовым ядром с полной шириной на полувысоте (FWHM), равной 8 мм. При этом средний сигнал для региона, с которым рассчитывалась коннективность (в методе seed-to-voxel, описанном ниже), вычислялся по несглаженным данным, чтобы избежать примешивания сигнала соседних регионов.

Кроме того, из функциональных данных с помощью регрессии были удалены вклады артефактов, пропорциональные сигналу белого вещества (пять главных компонент), ликвора (пять главных компонент), параметрам движения и их производным первого порядка (12 регрессоров), сканам-выбросам, эффекту сессии и его производной первого порядка (два регрессора), а также линейный тренд (два регрессора), с последующей полосовой фильтрацией в диапазоне 0,008–0,09 Гц.

Анализ данных фМРТ покоя с целью выбора мишеней для стимуляции

Была проанализирована литература, посвященная решению задачи нахождения индивидуального разбиения поверхности коры на функциональные сети покоя и выбора в имеющихся зонах оптимальной точки в рамках данного участка сети. Был определен оптимальный набор подходов на каждом из этапов анализа данных, который затем был объединен в алгоритм выбора персонализированных мишеней для рТМС. Основные шаги этого алгоритма представлены ниже.

Алгоритм выбора персонализированных мишеней для рТМС, входящих в лобно-теменную сеть контроля (fronto-parietal control network, FPCN)

Шаг 1. Построение карты степени принадлежности точек мозга сети FPCN.

Используется метод seed-to-voxel — расчет коннективности данного региона (называемого seed-регионом) с остальными вокселями мозга. Метод применяется к индивидуальным данным фМРТ покоя. В качестве seed-региона используется маска сети FPCN, полученная в работе [20] по средней коннективности в группе из 1000 здоровых добровольцев. Полученная карта seed-коннективности принимается в качестве карты степени принадлежности точек мозга сети FPCN.

Шаг 2. Формирование набора вокселей-кандидатов для выбора мишеней, лежащих на поверхности мозга.

Отбираются воксели, лежащие на поверхности мозга. Для этого применяется функция `spr_erode` к маске внутричерепного объема из пакета SPM, приведенной

к индивидуальному пространству данного испытуемого. Эта функция вычисляет область, получаемую из заданной области удалением одного слоя вокселей с ее поверхности. Воксели, удаленные этой функцией, вычисляются вычитанием масок внутричерепного объема до и после применения `spr_erode`. Набор этих вокселей принимается за границу внутричерепного объема, среди них производится дальнейший выбор мишеней.

Шаг 3. Отбор вокселей-кандидатов, лежащих в заданных целевых регионах.

Среди полученных на предыдущем шаге вокселей отбираются лежащие в целевых регионах: ДЛПФК и ЗТК.

Левая ДЛПФК была определена как часть левой средней лобной извилины, не включающая премоторную кору. Маска левой средней лобной извилины была взята из атласа, созданного А. Hammers и коллегами [21]. Маска премоторной коры была получена объединением зон левой дорзальной и вентральной премоторной коры из шаблона HMAT (Human Motor Area Template, [22]). Левая задняя теменная кора была определена как объединение левых надкраевой и угловой извилин и верхней теменной долики по данным атласа А. Hammers.

Шаг 4. Выбор мишеней по методу прожектора («searchlight») [13, 14].

Для каждого из выбранных на предыдущих шагах вокселей рассчитывается мера качества, равная среднему от значений из описанной выше карты seed-коннективности в рамках сферы с центром в данном вокселе и радиусом 5 мм (для учета влияния стимуляции на определенный участок коры вокруг точки-мишени). В качестве мишеней выбираются воксели с максимальным значением этой меры качества в рамках каждого из целевых регионов.

Анализ пространственной локализации мишеней

Индивидуальные мишени для каждого испытуемого были приведены к пространству MNI с помощью созданного в процессе предобработки данных МРТ поля деформации, преобразующего структурное изображение в это пространство. Были рассчитаны средние по группе и стандартные отклонения координат этих мишеней для описания распределения их локализации у различных испытуемых. Были вычислены расстояния от мишеней в ДЛПФК до моторной коры в области коркового представительства мышц кисти. Для этого использовали групповую карту активации (для 486 испытуемых) при движении пальцами правой руки по данным Human Connectome Project [23], загруженную из базы данных Neurovault (идентификатор набора данных <https://identifiers.org/neurovault.image:3162>). Эта карта была бинаризована с порогом $Z > 22$, подобранным таким образом, чтобы выделить кластер в области прецентральной извилины, не включая других близко расположенных кластеров. Для каждой мишени в ДЛПФК вычисляли расстояние до ближайшего к ней вокселя в полученной бинаризованной карте активации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании анализа литературы разработан алгоритм определения координат точек в пределах индивидуальных хабов FPCN в ДЛПФК и ЗТК, которые могут быть использованы в качестве мишеней для рТМС.

Для каждого добровольца определены координаты мишеней в двух областях коры (таблица).

Таблица. Индивидуальные координаты мишеней в области дорсолатеральной префронтальной и задней теменной коры левого полушария

№	Область коры						Расстояние между М1 и мишенью в ДЛПФК, мм
	ДЛПФК			ЗТК			
	Координата по оси x	Координата по оси y	Координата по оси z	Координата по оси x	Координата по оси y	Координата по оси z	
1	-41	51	14	-27	-69	59	75
2	-45	48	6	-46	-57	52	76
3	-47	28	36	-39	-60	57	44
4	-41	47	21	-46	-48	58	68
5	-41	34	36	-54	-40	52	50
6	-43	48	14	-51	-53	50	72
7	-44	47	14	-51	-48	52	71
8	-49	28	32	-51	-47	52	46
9	-43	47	13	-55	-42	51	72
10	-51	21	34	-38	-72	46	39
11	-50	25	30	-39	-64	54	44
12	-46	46	9	-50	-52	52	72
13	-44	39	28	-56	-42	50	57
14	-47	43	8	-50	-51	53	71
15	-45	24	42	-45	-61	51	39
16	-42	52	6	-52	-48	51	80
17	-48	43	9	-51	-51	51	70
18	-41	40	30	-46	-57	54	59
19	-45	46	11	-60	-29	44	72
20	-40	35	37	-58	-42	46	51
21	-44	47	12	-57	-49	43	72
22	-40	51	17	-43	-54	57	73
23	-46	47	6	-46	-49	58	75
24	-45	48	6	-45	-54	56	76

Примечание: ДЛПФК — дорсолатеральная префронтальная кора, ЗТК — задняя теменная кора, М1 — первичная моторная кора.

После приведения каждой мишени к пространству MNI средние по группе координаты мишеней в ДЛПФК равны -44,6, 41,1, 19,7 мм, стандартные отклонения — 3,1, 9,5, 12,0 мм. Для мишеней в ЗТК средние координаты равны -48,2, -51,7, 52,0 мм, стандартные отклонения 7,6, 9,6, 4,2 мм. Для ДЛПФК среднее расстояние мишеней от их средней точки составило 14,3 мм, максимальное — 28,3 мм, для ЗТК — 10,4 мм и 28 мм соответственно. Максимальное из расстояний между парами мишеней в ДЛПФК равно 45,9 мм, в ЗТК — 54,1 мм (рис. 1).

Несмотря на сопоставимые линейные метрики разброса мишеней, объем многогранников, рассчитанных методом выпуклых оболочек и содержащих множества точек для каждой из оцениваемых областей, оказался для ДЛПФК почти в 3 раза больше, чем для ЗТК (2095 мм³ и 739 мм³ соответственно) (рис. 2).

При наложении мишеней на маску FPCN, использованную в качестве seed-региона в расчетах индивидуальной коннективности, в области ДЛПФК все мишени находились в пределах маски, тогда как в области ЗТК часть мишеней находилась за ее пределами (рис. 3).

При оценке расстояний от индивидуальных мишеней в ДЛПФК до первичной моторной коры (М1) среднее значение составило 64 мм, стандартное отклонение — 13 мм (таблица). При этом только у 6 добровольцев (25%) дистанция не превышала 50 мм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании предложен алгоритм персонализированного выбора мишеней на основе выделения индивидуальных хабов FPCN в пределах ДЛПФК и ЗТК. Продемонстрирована высокая межиндивидуальная вариабельность мишеней, при этом пространственный разброс точек был выше в ДЛПФК, однако все индивидуальные мишени в ДЛПФК лежали в пределах использованной маски FPCN, тогда как для ЗТК ряд мишеней оказались вне этой маски. Анализ вариабельности локализации полученных мишеней позволяет утверждать, что ни в одной из заданных областей не существует единого универсального положения стимулирующей катушки, которое позволяло бы эффективно стимулировать мишени у всех добровольцев. Кроме того, согласно полученным данным, только у 25% участников исследования расстояние между зонами М1 и ДЛПФК не превышало 5 см, что подтверждает некорректность применения рутинного «правила 5 см» для позиционирования катушки, по крайней мере на популяции здоровых лиц.

Разработанный алгоритм персонализации выбора мишеней позволяет определять индивидуальную локализацию мишеней в двух ключевых хабах FPCN. При этом локализация полученных мишеней у добровольцев была вариабельна как в ДЛПФК, так и в ЗТК. Более

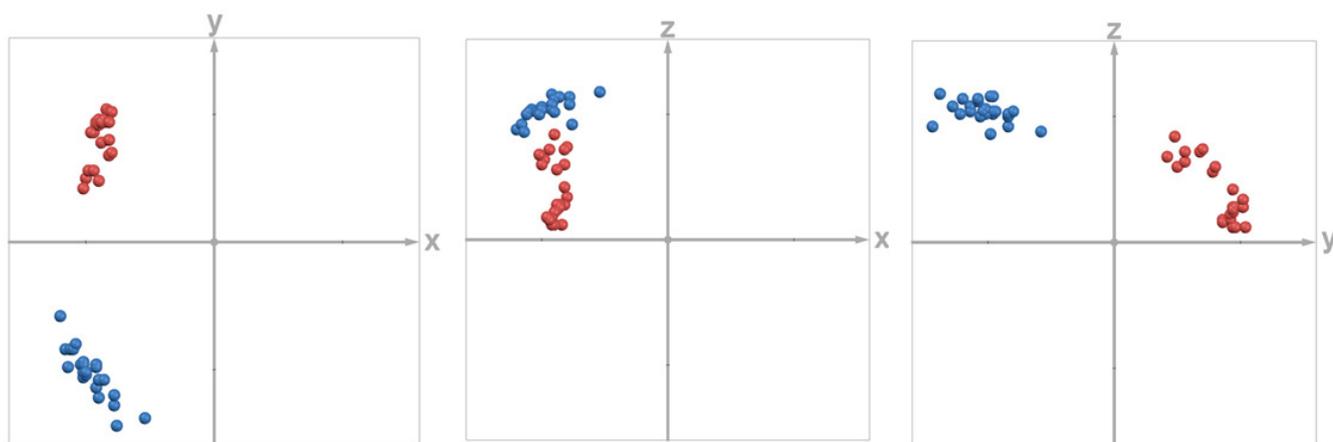


Рис. 1. Проекция расположения мишеней 24 испытуемых плоскостях системы координат. Красным показаны мишени в ДЛПФК, синим — мишени в задней теменной коре

того, размер стимулируемой области для большинства восьмеркообразных катушек, используемых наиболее часто для рТМС (см. подробнее расчеты в [24]), меньше, чем размер области разброса индивидуальных мишеней как в ДЛПФК, так и в ЗТК. Таким образом, очевидно, что не существует единого универсального положения стимулирующей катушки, которое позволяло бы эффективно стимулировать мишени у всех добровольцев, ни в одной из заданных областей. Эти данные ставят под сомнение широко применяемую как в научных исследованиях, так и в клинической практике концепцию «one-fits-all», когда используется универсальный (одинаковый для всех испытуемых/пациентов) подход для определения мишени в регионе интереса, опирающийся на анатомические (например, заданные координаты в пространстве MNI) или поверхностные (например, «правило 5 см») ориентиры. В пользу некорректности такой концепции свидетельствуют данные о том, что в высоко гетерогенных регионах, таких как ДЛПФК, одна и та же анатомическая зона может быть частью разных сетей и, соответственно, нейросетевые эффекты стимуляции такой зоны будут отличаться [25].

Продемонстрировано сходство в локализации полученных мишеней в ДЛПФК как хабе FPCN при сопоставлении с имеющимися в литературе данными. Так, среднее из мишеней, соответствующих пикам независимой

компоненты левой части сети FPCN, идентифицированной визуально среди результатов анализа независимых компонент (independent component analysis, ICA), полученных в работе [26], находилось в точке с координатами $(-38, -39, 17)$ в пространстве MNI. Эта точка расположена на расстоянии 7.4 мм от средней точки, полученной в нашей работе, по направлению в глубину мозга (рис. 4). Более поверхностное расположение мишеней в настоящем исследовании объясняется особенностями методологии. Учитывая ограничение глубины воздействия магнитного поля при рТМС, мы ограничивали глубину расположения мишеней границей интракраниального объема, которая была найдена с помощью функции `spm_erode` пакета SPM.

Нами было выявлено, что среднее расстояние между зоной кисти первичной моторной коры (M1) и мишенями в ДЛПФК превышает 6 см. Полученные данные имеют значение в контексте оценки валидности «правила 5 см» как подхода к локализации мишени для рТМС в ДЛПФК. Первоначально такой подход был предложен в исследованиях, посвященных терапии фармакорезистентной депрессии [27]. Однако в дальнейшем ввиду простоты и удобства его стали широко применять для локализации мишеней в ДЛПФК и при других заболеваниях, а также в исследованиях у здоровых добровольцев. По нашим данным, лишь у 25% испытуемых

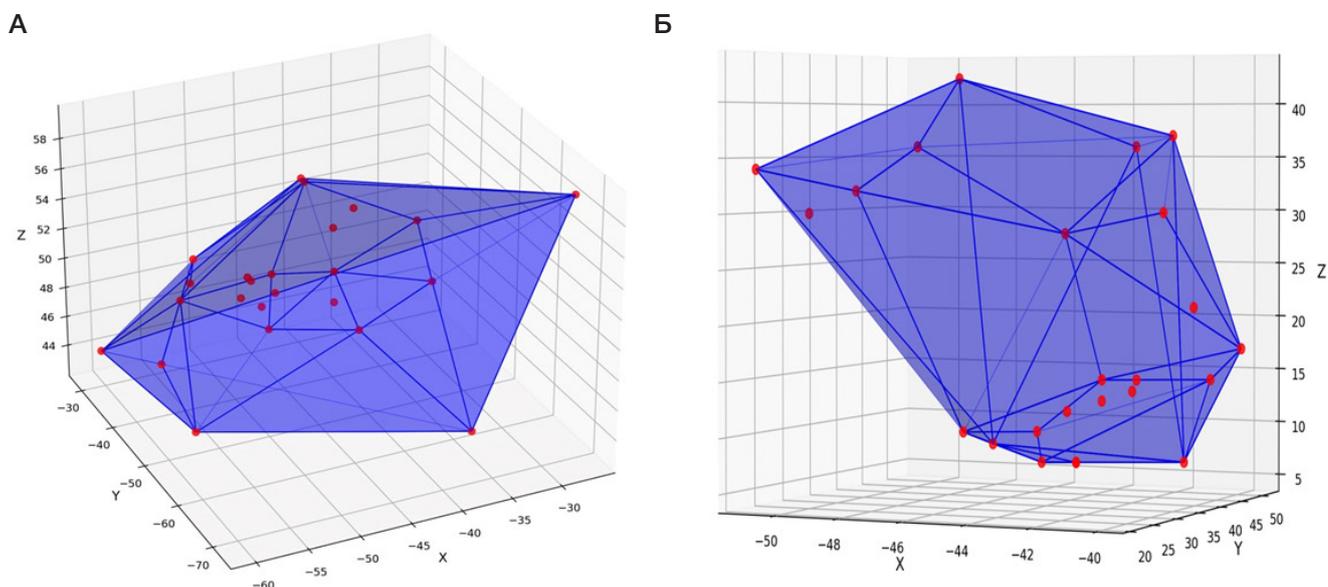


Рис. 2. Выпуклые оболочки множеств точек с координатами мишеней в ЗТК (А) и ДЛПФК (Б)

расстояние между мишенью в ДЛПФК и зоной кисти в M1 не превышало 5 см. При этом важно отметить, что мы оценивали кратчайшее расстояние между двумя точками, тогда как «правило 5 см» предполагает оценку расстояния между их проекциями по выпуклой поверхности скальпа. Эти данные подтверждают результаты многочисленных исследований, показывающих, что при использовании «правила 5 см» полученная мишень смещена каудально относительно мишеней, получаемых при использовании нейронавигационных систем с опорой на анатомические и функциональные данные, и зачастую вообще находится в пределах премоторной коры — другой анатомической области, имеющей иные функции и связи [28–30].

При сопоставлении областей, образованных множествами мишеней в двух заданных регионах между собой и с маской FPCN, использованной в качестве seed-региона, показано, что при сопоставимых линейных метриках разброса мишеней объем многогранника, в вершинах которого лежат полученные индивидуальные мишени, для ДЛПФК значительно выше, чем для ЗТК. Вместе с тем, все индивидуальные мишени в ДЛПФК лежат в пределах маски FPCN, тогда как для ЗТК ряд мишеней находится вне этой маски. Полученные результаты свидетельствуют о высокой межиндивидуальной вариабельности топографии обоих хабов FPCN, что только подчеркивает необходимость персонализации подхода к выбору мишени.

Отдельного обсуждения требует предлагаемый алгоритм определения мишеней. Для нахождения индивидуального разбиения поверхности коры на функциональные сети покоя нами был использован алгоритм, схожий с первым шагом итеративного метода [9]: групповая маска лобно-теменной сети контроля из работы [20] использована в качестве seed-региона при анализе индивидуальных данных фМРТ покоя. При первоначальном анализе литературы оптимальным для выполнения задачи индивидуального выделения сетей покоя представлялся метод MS-HBM [11], позволяющий выделять наиболее однородный сигнал в получаемых регионах. Однако данный метод не позволяет оценить степень уверенности в принадлежности каждой точки данной сети, что требуется для выбора оптимальной точки в рамках данного участка сети. Подходы, включающие анализ независимых компонент, были отвергнуты нами ввиду необходимости сопоставления компонент, полученных из индивидуальных данных, известным сетям, полученным ранее на групповых данных. При этом такое сопоставление может выполняться как с помощью визуального сравнения топографии [26], так и автоматическими методами [31, 32], но в обоих случаях возможны ситуации с высокой неопределенностью в соотношении сетей, затрудняющие интерпретацию результатов.

Для выбора мишени по данной карте коннективности был использован метод прожектора («searchlight»), который позволяет учитывать разнородность сигнала от соседних вокселей в пределах искомого областей. Однако локализация мишени в данном случае зависела от размеров сферы, задаваемой исследователем. Мы использовали радиус сферы 5 мм, принимая во внимание размеры стимулируемой при рТМС области [24]. Таким образом, разработанный алгоритм соответствовал задаче определить индивидуальные мишени для рТМС на основе выявления хабов FPCN.

Ограничения исследования

Одним из ограничений настоящего исследования является небольшой размер выборки испытуемых. Однако даже на

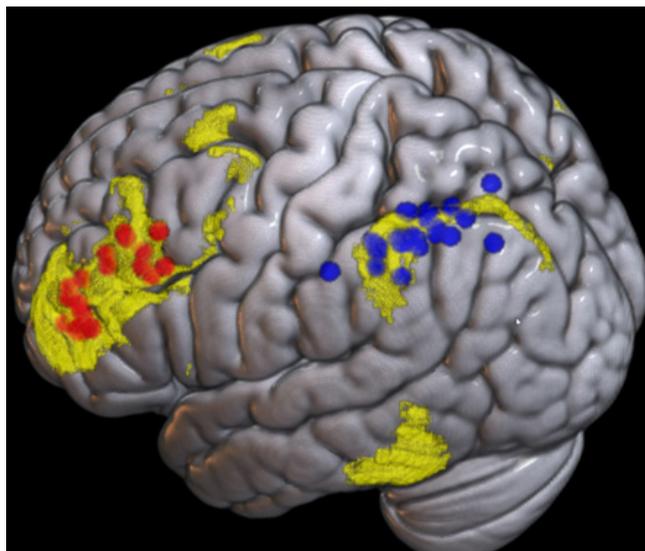


Рис. 3. Расположение мишеней для всех испытуемых в пространстве MNI. Желтым показана групповая маска лобно-теменной сети контроля (frontoparietal control network, FPCN) из работы [20], использованная в качестве seed-региона в расчетах индивидуальной коннективности. Красным показаны индивидуальные мишени в рамках ДЛПФК (определенной как часть средней лобной извилины, не включающая премоторную кору), синим — мишени в задней теменной коре (определенной как объединение надкраевой и угловой извилин и верхней теменной долики). Данные изображены на шаблоне mni152 из программы MRICroGL

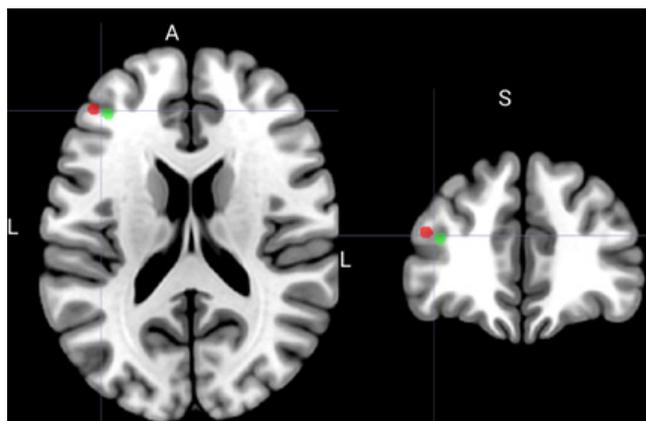


Рис. 4. Сопоставление средних положений мишеней в ДЛПФК в пространстве MNI по данным настоящего исследования (красный) и работы [26] (показаны зеленым). В работе [26] средняя точка определялась среди мишеней в ДЛПФК, найденных как пики независимых компонент индивидуального сигнала фМРТ покоя, визуально идентифицированных как сеть FPCN

такой выборке была показана гетерогенность расположения мишеней для рТМС, обосновывающая важность персонализированного подхода. Другим ограничением является включение только здоровых добровольцев молодого и среднего возраста, в связи с чем в будущих работах необходимо проведение подобного анализа у здоровых лиц старшего и пожилого возраста, а также у пациентов с когнитивными нарушениями различного генеза. Следует также отметить, что в рамках настоящей работы нейровизуализационное исследование проводили на МР-томографе с величиной магнитной индукции 3 Тл. Представляется целесообразной валидация предложенного алгоритма на данных, полученных при использовании МР-томографов с индукцией 1–1,5 Тл, которые значительно более доступны. Кроме того, в данной работе не проводили оценку стабильности между сессиями для выделяемой индивидуальной сети FPCN и выбираемых по ней мишеней в ДЛПФК и ЗТК. Заметим, что в результате

концептуально аналогичной используемому методу первой итерации алгоритма [9] индивидуальное разбиение на сети покоя для данных Human Connectome Project имело воспроизводимость около 0,9, которая была измерена как доля вокселей, попадающих в ту же сеть при повторном исследовании (при этом данные имели приблизительно вдвое большие длительность и временное разрешение).

ВЫВОДЫ

Персонализация выбора мишени для рТМС — актуальная задача, решение которой может значительно увеличить эффективность применения метода в клинической практике и научных исследованиях. Анализ индивидуальных карт сетей покоя позволяет получать персонализированные мишени, локализация которых характеризуется высокой межиндивидуальной вариабельностью. В то же время

следует отметить, что проведение такого анализа сопряжено с целым рядом методологических проблем и требует обоснованного выбора того или иного подхода на каждом этапе. В рамках исследования нами предложен алгоритм выбора персонализированных мишеней для рТМС по данным фМРТ покоя в ДЛПФК и ЗТК, которые являются ключевыми хабами FPCN и основными мишенями для рТМС как у пациентов с когнитивными нарушениями, так и у здоровых лиц в работах по модуляции когнитивных функций. Разработка автоматизированных алгоритмов анализа фМРТ покоя с учетом особенностей задачи — определение мишеней для рТМС — может в дальнейшем способствовать более широкому распространению персонализированной рТМС. В будущих рандомизированных контролируемых исследованиях необходимо подтверждение повышения эффективности рТМС при использовании разработанного подхода к персонализированному выбору мишеней.

Литература

- Chen M, Zhao G, Peng L. Transcranial Magnetic Stimulation Applications in the Study of Executive Functions: A Review. *Brain Behav.* 2024; 14 (11): e70099.
- Sun W, Wu Q, Gao L, Zheng Z, Xiang H, Yang K, et al. Advancements in Transcranial Magnetic Stimulation Research and the Path to Precision. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2023; 19: 1841–51.
- Tik M, Hoffmann A, Slacky R, Tomova L, Hummer A, Navarro de Lara L, et al. Towards understanding rTMS mechanism of action: Stimulation of the DLPFC causes network-specific increase in functional connectivity. *Neuroimage.* 2017; 162: 289–96.
- Ørbo MC, Højer S, Vangberg TR, Csifcsak G, Grønli OK, Aslaksen PM. The cerebral and cognitive changes after intermittent theta burst stimulation (iTBS) treatment for depression: study protocol for a randomized double-blind sham-controlled trial. *Trials.* 2024; 25 (1): 752.
- Smith S, Duff E, Groves A, Nichols TE, Jbabdi S, Westlye LT, et al. Structural Variability in the Human Brain Reflects Fine-Grained Functional Architecture at the Population Level. *J Neurosci.*; 39 (31): 6136–49.
- Lioumis P, Roine T, Granö I, Aydogan DB, Ukharova E, Souza VH, et al. Optimization of TMS target engagement: current state and future perspectives. *Front Neurosci.* 2025; 19: 1517228.
- Caulfield KA, Fleischmann HH, Cox CE, Wolf JP, George MS, McTeague LM. Neuronavigation maximizes accuracy and precision in TMS positioning: Evidence from 11,230 distance, angle, and electric field modeling measurements. *Brain Stimul.* 2022; 15 (5): 1192–205.
- Cash RFH, Zalesky A. Personalized and Circuit-Based Transcranial Magnetic Stimulation: Evidence, Controversies, and Opportunities. *Biol Psychiatry.* 2024; 95 (6): 510–22.
- Wang D, Buckner RL, Fox MD, Holt DJ, Holmes AJ, Stoecklein S, et al. Parcellating cortical functional networks in individuals. *Nat Neurosci.* 2015; 18 (12): 1853–60.
- Gordon EM, Laumann TO, Gilmore AW, Newbold DJ, Greene DJ, Berg JJ, et al. Precision Functional Mapping of Individual Human Brains. *Neuron.* 2017; 95 (4): 791–807.e7.
- Kong R, Li J, Orban C, Sabuncu MR, Liu H, Schaefer A, et al. Spatial Topography of Individual-Specific Cortical Networks Predicts Human Cognition, Personality, and Emotion. *Cereb Cortex.* 2019; 29 (6): 2533–51.
- Ning L, Makris N, Camprodon JA, Rathi Y. Limits and reproducibility of resting-state functional MRI definition of DLPFC targets for neuromodulation. *Brain Stimul.* 2019; 12 (1): 129–38.
- Fox MD, Liu H, Pascual-Leone A. Identification of reproducible individualized targets for treatment of depression with TMS based on intrinsic connectivity. *Neuroimage.* 2013; 66: 151–60.
- Cash RFH, Cocchi L, Lv J, Wu Y, Fitzgerald PB, Zalesky A. Personalized connectivity-guided DLPFC-TMS for depression: Advancing computational feasibility, precision and reproducibility. *Hum Brain Mapp.* 2021; 42 (13): 4155–72.
- Menon V, D'Esposito M. The role of PFC networks in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology.* 2022; 47 (1): 90–103.
- Xia H, He Q, Chen A. Understanding cognitive control in aging: A brain network perspective. *Front Aging Neurosci.* 2022; 14: 1038756.
- Ebrahimzadeh E, Sadjadi SM, Asgarinejad M, Dehghani A, Rajabion L, Soltanian-Zadeh H. Neuroenhancement by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on DLPFC in healthy adults. *Cogn Neurodyn.* 2025; 19 (1): 34.
- Zhang Y, Dong K, Yang J, Guo Q, Zhao Y, Zhu X, et al. Comparative efficacy of rTMS on different targets in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Front Aging Neurosci.* 2025; 17: 1536573.
- Xu M, Nikolin S, Samaritunga N, Chow EJJ, Loo CK, Martin DM. Cognitive Effects Following Offline High-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (HF-rTMS) in Healthy Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychol Rev.* 2024; 34 (1): 250–76.
- Yeo BT, Krienen FM, Sepulcre J, Sabuncu MR, Lashkari D, Hollinshead M, et al. The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *J Neurophysiol.* 2011; 106 (3): 1125–65.
- Hammers A, Allom R, Koeppe MJ, Free SL, Myers R, et al. Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe. *Hum Brain Mapp.* 2003;19(4):224-47.
- Mayka MA, Corcos DM, Leurgans SE, Vaillancourt DE. Three-dimensional locations and boundaries of motor and premotor cortices as defined by functional brain imaging: a meta-analysis. *Neuroimage.* 2006;31(4):1453-74.
- Van Essen DC, Smith SM, Barch DM, Behrens TE, Yacoub E, Ugurbil K; et al. The WU-Minn Human Connectome Project: an overview. *Neuroimage.* 2013; 80: 62–79.
- Drakaki M, Mathiesen C, Siebner HR, Madsen K, Thielscher A. Database of 25 validated coil models for electric field simulations for TMS. *Brain Stimul.* 2022; 15 (3): 697–706.
- Lynch CJ, Elbau IG, Ng TH, Wolk D, Zhu S, Ayaz A, et al. Automated optimization of TMS coil placement for personalized functional network engagement. *Neuron.* 2022; 110 (20): 3263–77.
- Sayalı C, Gogulski J, Granö I, Lioumis P, Barrett F. Test-retest reliability of TMS-evoked potentials over fMRI-based definitions of non-motor cortical targets. *bioRxiv* 2024.12.20.629675.
- Pascual-Leone A, Rubio B, Pallardó F, Catalá MD. Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of left dorsolateral prefrontal cortex in drug-resistant depression. *Lancet.* 1996; 348 (9022):

233–7.

28. Tsukuda B, Ikeda S, Minami S, Katsura K, Shimizu T, Kame T, et al. Targeting Method for rTMS for Treating Depression in Japanese Patients: A Comparison of the Standard, F3, and Neuronavigation Approaches. *Neuropsychobiology*. 2024; 83 (3–4): 170–8.
29. Fitzgerald PB. Targeting repetitive transcranial magnetic stimulation in depression: do we really know what we are stimulating and how best to do it? *Brain Stimul*. 2021; 14 (3): 730–6.
30. Ahdab R, Ayache SS, Brugières P, Goujon C, Lefaucheur JP. Comparison of "standard" and "navigated" procedures of TMS coil positioning over motor, premotor and prefrontal targets in patients with chronic pain and depression. *Neurophysiol Clin*. 2010; 40 (1): 27–36.
31. Bagattini C, Brignani D, Bonni S, Quattrini G, Gasparotti R, Pievani M. Functional Imaging to Guide Network-Based TMS Treatments: Toward a Tailored Medicine Approach in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2021; 15: 687493.
32. Castrillon G, Sollmann N, Kurcyus K, Razi A, Krieg SM, Riedl V. The physiological effects of noninvasive brain stimulation fundamentally differ across the human cortex. *Sci Adv*. 2020; 6 (5): eaay2739.

References

1. Chen M, Zhao G, Peng L. Transcranial Magnetic Stimulation Applications in the Study of Executive Functions: A Review. *Brain Behav*. 2024; 14 (11): e70099.
2. Sun W, Wu Q, Gao L, Zheng Z, Xiang H, Yang K, et al. Advancements in Transcranial Magnetic Stimulation Research and the Path to Precision. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2023; 19: 1841–51.
3. Tik M, Hoffmann A, Sladky R, Tomova L, Hummer A, Navarro de Lara L, et al. Towards understanding rTMS mechanism of action: Stimulation of the DLPFC causes network-specific increase in functional connectivity. *Neuroimage*. 2017; 162: 289–96.
4. Ørbo MC, Høier S, Vangberg TR, Csifcsak G, Grønli OK, Aslaksen PM. The cerebral and cognitive changes after intermittent theta burst stimulation (iTBS) treatment for depression: study protocol for a randomized double-blind sham-controlled trial. *Trials*. 2024; 25 (1): 752.
5. Smith S, Duff E, Groves A, Nichols TE, Jbabdi S, Westlye LT, et al. Structural Variability in the Human Brain Reflects Fine-Grained Functional Architecture at the Population Level. *J Neurosci*. 2013; 33 (31): 6136–49.
6. Lioumis P, Roine T, Granö I, Aydogan DB, Ukharova E, Souza VH, et al. Optimization of TMS target engagement: current state and future perspectives. *Front Neurosci*. 2025; 19: 1517228.
7. Caulfield KA, Fleischmann HH, Cox CE, Wolf JP, George MS, McTeague LM. Neuronavigation maximizes accuracy and precision in TMS positioning: Evidence from 11,230 distance, angle, and electric field modeling measurements. *Brain Stimul*. 2022; 15 (5): 1192–205.
8. Cash RFH, Zalesky A. Personalized and Circuit-Based Transcranial Magnetic Stimulation: Evidence, Controversies, and Opportunities. *Biol Psychiatry*. 2024; 95 (6): 510–22.
9. Wang D, Buckner RL, Fox MD, Holt DJ, Holmes AJ, Stoeklein S, et al. Parcellating cortical functional networks in individuals. *Nat Neurosci*. 2015; 18 (12): 1853–60.
10. Gordon EM, Laumann TO, Gilmore AW, Newbold DJ, Greene DJ, Berg JJ, et al. Precision Functional Mapping of Individual Human Brains. *Neuron*. 2017; 95 (4): 791–807.e7.
11. Kong R, Li J, Orban C, Sabuncu MR, Liu H, Schaefer A, et al. Spatial Topography of Individual-Specific Cortical Networks Predicts Human Cognition, Personality, and Emotion. *Cereb Cortex*. 2019; 29 (6): 2533–51.
12. Ning L, Makris N, Camprodon JA, Rathi Y. Limits and reproducibility of resting-state functional MRI definition of DLPFC targets for neuromodulation. *Brain Stimul*. 2019; 12 (1): 129–38.
13. Fox MD, Liu H, Pascual-Leone A. Identification of reproducible individualized targets for treatment of depression with TMS based on intrinsic connectivity. *Neuroimage*. 2013; 66: 151–60.
14. Cash RFH, Cocchi L, Lv J, Wu Y, Fitzgerald PB, Zalesky A. Personalized connectivity-guided DLPFC-TMS for depression: Advancing computational feasibility, precision and reproducibility. *Hum Brain Mapp*. 2021; 42 (13): 4155–72.
15. Menon V, D'Esposito M. The role of PFC networks in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology*. 2022; 47 (1): 90–103.
16. Xia H, He Q, Chen A. Understanding cognitive control in aging: A brain network perspective. *Front Aging Neurosci*. 2022; 14: 1038756.
17. Ebrahimzadeh E, Sadjadi SM, Asgarinejad M, Dehghani A, Rajabion L, Soltanian-Zadeh H. Neuroenhancement by repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on DLPFC in healthy adults. *Cogn Neurodyn*. 2025; 19 (1): 34.
18. Zhang Y, Dong K, Yang J, Guo Q, Zhao Y, Zhu X, et al. Comparative efficacy of rTMS on different targets in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Front Aging Neurosci*. 2025; 17: 1536573.
19. Xu M, Nikolin S, Samaratinga N, Chow EJH, Loo CK, Martin DM. Cognitive Effects Following Offline High-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation (HF-rTMS) in Healthy Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuropsychol Rev*. 2024; 34 (1): 250–76.
20. Yeo BT, Krienen FM, Sepulcre J, Sabuncu MR, Lashkari D, Hollinshead M, et al. The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *J Neurophysiol*. 2011; 106 (3): 1125–65.
21. Hammers A, Allom R, Koeppe MJ, Free SL, Myers R, et al. Three-dimensional maximum probability atlas of the human brain, with particular reference to the temporal lobe. *Hum Brain Mapp*. 2003; 19(4):224-47.
22. Mayka MA, Corcos DM, Leurgans SE, Vaillancourt DE. Three-dimensional locations and boundaries of motor and premotor cortices as defined by functional brain imaging: a meta-analysis. *Neuroimage*. 2006;31(4):1453-74.
23. Van Essen DC, Smith SM, Barch DM, Behrens TE, Yacoub E, Ugurbil K; et al. The WU-Minn Human Connectome Project: an overview. *Neuroimage*. 2013; 80: 62–79.
24. Drakaki M, Mathiesen C, Siebner HR, Madsen K, Thielscher A. Database of 25 validated coil models for electric field simulations for TMS. *Brain Stimul*. 2022; 15 (3): 697–706.
25. Lynch CJ, Elbau IG, Ng TH, Wolk D, Zhu S, Ayaz A, et al. Automated optimization of TMS coil placement for personalized functional network engagement. *Neuron*. 2022; 110 (20): 3263–77.
26. Sayalı C, Gogulski J, Granö I, Lioumis P, Barrett F. Test-retest reliability of TMS-evoked potentials over fMRI-based definitions of non-motor cortical targets. *bioRxiv* 2024.12.20.629675.
27. Pascual-Leone A, Rubio B, Pallaró F, Catalá MD. Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of left dorsolateral prefrontal cortex in drug-resistant depression. *Lancet*. 1996; 348 (9022): 233–7.
28. Tsukuda B, Ikeda S, Minami S, Katsura K, Shimizu T, Kame T, et al. Targeting Method for rTMS for Treating Depression in Japanese Patients: A Comparison of the Standard, F3, and Neuronavigation Approaches. *Neuropsychobiology*. 2024; 83 (3–4): 170–8.
29. Fitzgerald PB. Targeting repetitive transcranial magnetic stimulation in depression: do we really know what we are stimulating and how best to do it? *Brain Stimul*. 2021; 14 (3): 730–6.
30. Ahdab R, Ayache SS, Brugières P, Goujon C, Lefaucheur JP. Comparison of "standard" and "navigated" procedures of TMS coil positioning over motor, premotor and prefrontal targets in patients with chronic pain and depression. *Neurophysiol Clin*. 2010; 40 (1): 27–36.
31. Bagattini C, Brignani D, Bonni S, Quattrini G, Gasparotti R, Pievani M. Functional Imaging to Guide Network-Based TMS Treatments: Toward a Tailored Medicine Approach in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2021; 15: 687493.
32. Castrillon G, Sollmann N, Kurcyus K, Razi A, Krieg SM, Riedl V. The physiological effects of noninvasive brain stimulation fundamentally differ across the human cortex. *Sci Adv*. 2020; 6 (5): eaay2739.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ИПСК В ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ЭПИТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ В ТРЕХМЕРНЫХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Е. Б. Жигмитова¹, А. В. Косых¹, Н. Г. Гурская^{1,2} ✉

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

² Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Москва, Россия

Заболевания, связанные с дефицитом лимбальных стволовых клеток (хронические эрозии, рубцевание роговицы), требуют новых подходов регенеративной медицины. Цель исследования — разработать протокол получения клеток-предшественников эпителия лимба и роговицы из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК). Использовали метод дифференцировки иПСК в направлении органоида глаза для получения трехмерных гетерогенных структур за три недели. Полученные органоиды содержат клетки-предшественники эпителия роговицы, экспрессирующие кератин 3 и коллаген 7, что подтверждает возможность генерации функционального эпителия *in vitro*. Протокол позволяет создавать изогенные пациент-специфичные линии для терапии лимбальной недостаточности и дистрофического буллезного эпидермолиза, в том числе после предварительного редактирования генома иПСК.

Ключевые слова: иПСК, сфероид, дифференцировка, органоид глаза, эпителий, лимб, роговица, коллаген 7

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Министерства здравоохранения РФ, проект №124021000001-09.

Благодарности: члену-корреспонденту РАН, профессору М. А. Лагарьковой за обсуждение работы, плодотворную дискуссию и критические замечания.

Вклад авторов: Е. Б. Жигмитова — дизайн и проведение эксперимента; А. В. Косых — обработка материала, микросъемка и подготовка статьи; Н. Г. Гурская — концепция, дизайн работы, редактирование первичной рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Надежда Георгиевна Гурская
ул. Островитянова, д. 1, стр. 1, г. Москва, 117997, Россия; ngurskaya@mail.ru

Статья получена: 25.11.2025 **Статья принята к печати:** 12.12.2025 **Опубликована онлайн:** 27.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.070

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/>).

DIFFERENTIATION OF IPSCS INTO CORNEAL EPITHELIAL PRECURSORS IN THREE-DIMENSIONAL *IN VITRO* CULTURE

Zhigmitova EB¹, Kosykh AV¹, Gurskaya NG^{1,2} ✉

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia.

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

Diseases associated with limbal stem cell deficiency, such as chronic epithelial erosion and corneal scarring, require new therapeutic approaches rooted in regenerative medicine. This study aimed to develop a protocol for obtaining progenitor cells of the epithelium of the limb and cornea from induced pluripotent stem cells (iPSCs). We differentiated iPSCs toward eye organoids to obtain three-dimensional heterogeneous structures within three weeks. The resulting organoids contain corneal epithelial progenitor cells expressing keratin 3 and collagen 7, which confirms the possibility of generating functional epithelium *in vitro*. The protocol enables the generation of isogenic, patient-specific cell lines for treating limbal insufficiency and dystrophic epidermolysis bullosa, including applications following preliminary genome editing of iPSCs.

Keywords: IPSC, spheroid, differentiation, eye organoid, epithelium, limbus, cornea, collagen 7

Funding: the work was supported by a grant from the Ministry of Health of the Russian Federation, project No. 124021000001-09.

Acknowledgements: the authors thank M. A. Lagarkova, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Professor, for fruitful discussion of the work and critical comments.

Author contribution: Zhigmitova EB — design and conduct of the experiment, Kosykh AV — material processing, micrography, preparation of the article, Gurskaya NG — concept, design of the work, primary manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nadezhda G. Gurskaya
Ostrovityanova, 1, str. 1, Moscow, 117997, Russia; ngurskaya@mail.ru

Received: 25.11.2025 **Accepted:** 12.12.2025 **Published online:** 27.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.070

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/>).

Слепота и нарушение зрения — глобальная проблема здравоохранения, затрагивающая, по данным ВОЗ, как минимум 2,2 млрд человек в мире, среди которых у 6,17 млн тяжелые нарушения зрения вызваны патологиями роговицы [1]. Трансплантация роговицы (кератопластика) восстанавливает зрение при ее тяжелых заболеваниях путем замены поврежденного участка донорским трансплантатом. Данный вид трансплантации,

выполняемый более 180 000 раз в год, считается самым распространенным и одним из самых успешных в этой области [2]. Однако потребность в донорской роговице намного превышает ее доступное количество, особенно в странах с ограниченными ресурсами. Это побуждает научное сообщество искать альтернативные решения аллотрансплантации роговицы, от использования децеллюляризованных ксенотрансплантатов роговицы до

внедрения методов тканевой инженерии и регенеративной медицины с использованием дифференцированных стволовых клеток [3, 4].

Глаз — это сложный орган, состоящий из высокоспециализированных тканей, происходящих из разных зачатков [5]. Сетчатка развивается из нейроэктодермы через зрительный пузырь, эпителий роговицы происходит от поверхностной эктодермы, а радужная оболочка и строма роговицы имеют происхождение от нервного гребня. Развитие методов дифференцировки из стволовых клеток в специализированные клетки глаза также способствует созданию перспективного ресурса для новых исследований морфогенеза и развития глаз.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки человека (иПСК) являются уникальной моделью, позволяющей использовать преимущества регенеративной медицины. По свойствам иПСК схожи с эмбриональными стволовыми клетками и способны дифференцироваться в самые различные типы клеток. Разнообразны методы получения иПСК и источники соматических клеток для их репрограммирования (от кератиноцитов и дермальных фибробластов, получаемых в ходе биопсии кожи, до мононуклеарных клеток периферической крови или клеток мочи доноров) для получения в конечном счете аутологичного материала.

Протоколы дифференцировки из иПСК условно можно подразделить на две группы — с использованием стандартных протоколов ведения клеточных культур в виде суспензии и с использованием трехмерных моделей [6, 7].

Согласно прогнозу [8], в последние годы значительно выросло количество клинических исследований, посвященных использованию трансплантаций пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), полученного в результате дифференцировки иПСК. Сетчатка млекопитающих во взрослом возрасте лишена значительного регенеративного потенциала, самопроизвольного восстановления функции при дегенеративных процессах не происходит. Врожденные и приобретенные дегенеративные заболевания сетчатки сопровождаются утратой фоторецепторов в ней, что приводит к тяжелой и необратимой потере зрения. На фоне значительного прогресса в понимании патогенеза дегенеративных заболеваний сетчатки ключевое значение приобретает разработка методов генерации клеток (ПЭС) из клеток-предшественников. Перспективными источниками являются аллогенные клетки и аутологичные, получаемые из пациент-специфичных клеток-предшественников ПЭС, способные потенциально компенсировать функциональные дефекты [6].

В отличие от сетчатки, передний эпителий роговицы взрослого организма способен к репаративной регенерации, хотя скорость и тип замещающей ткани зависят от выраженности травматических повреждений. При глубоких дефектах поражается не только эпителий, но и Боуменова мембрана, состоящая из коллагеновых волокон, и лежащая ниже часть стромы роговицы. В процессе репарации поражений происходит размножение эпителия, покрывающего раневой дефект, при этом часто формируется более толстый эпителиальный пласт, чем в норме. Дефекты нижележащих слоев замещаются фиброзной тканью грубоволокнистого (рубцового) содержания [9]. Помимо травмы различные заболевания и генетические нарушения могут привести к повреждению и дегенеративным изменениям роговицы. Среди заболеваний, влияющих на функционирование лимба и роговицы, выделяется синдром лимбальной

недостаточности (СЛН), буллезная кератинопатия (эндотелиально-эпителиальная дистрофия роговицы), а также симблефарон, при котором сращивание конъюнктивы стекловидного тела с внутренней поверхности века приводит к рубцовому перерождению роговицы. Так, например, офтальмологические осложнения распространены у пациентов с буллезным эпидермолизом (БЭ) в целом, но частота их возникновения значительно варьируется в зависимости от подтипа заболевания. Наиболее тяжелые проявления наблюдаются при рецессивном дистрофическом (РДБЭ) и пограничном подтипах. В результате нарушения синтеза коллагена VII типа у пациентов с РДБЭ помимо прочего возникают повторяющиеся эрозии роговицы, пузыри, рубцы, что приводит к таким осложнениям, как экспозиционный кератит и симблефарон [10].

Цель нашего исследования — разработка протокола, совмещающего преимущества различных подходов к получению органоида глаза и эпителия роговицы, в частности, путем культивирования дифференцируемых клеток в виде трехмерной модели.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуральная работа

иПСК (KYOU-DXR0109B) культивировали при 37 °C (5% CO₂) в среде mTESR (85850, STEMCELL Technologies Inc., Канада) на пластиковых чашках Петри, покрытых матригелем (356234, Corning, США). Для получения отдельных колоний иПСК высаживали по 3800 кл./см², и через 5 суток собирали сформированные колонии иПСК после обработки 0,4 мг/мл диспазой (17105041, Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), позволяющей открепить колонии от пластика без диссоциации на отдельные клетки.

Для последующего культивирования неадгезивных культур использовали Ultra low attachment чашки Петри (3261, Corning, США).

Переход между разными типами культуральных сред всегда осуществляли поэтапно в течение 4–5 дней по схеме:

- 1-й день: –1 мл/+1 мл;
- 2-й день: –1,5 мл/+1,5 мл;
- 3-й день: –2 мл/+2 мл и т. д.,

где «–» обозначает отбираемый объем текущей культуральной среды, а «+» — добавленный объем дифференцировочной среды следующей стадии.

Среда для эмбрионных тел (ЭТ) состояла из DMEM/F12 (C470п, «ПанЭко»; Россия) с добавлением 20% FBS (F800820, GlobeKang, Китай), 100 мкМ β-меркаптоэтанол (21985023, Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкМ MEM NEAA (Ф115/100, «ПанЭко», Россия), 1 мМ Пируват натрия (11360070, Thermo Fisher Scientific, США), 50 ед./мл раствора пенициллин-стрептомицина (15140122, Thermo Fisher Scientific, США) и 2 мМ GlutaMAX (35050061, Thermo Fisher Scientific, США) [11].

Среда XF-KO-SR (Xeno-free KnockOut Serum media) включала в себя DMEM (C455п, «ПанЭко», Россия) с 15% KnockOut SR XenoFree CTS (12618012, Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкМ β меркаптоэтанол (21985023, Thermo Fisher Scientific, США), 100 мкМ MEM NEAA (Ф115/100, «ПанЭко», Россия), 2 мМ GlutaMAX (35050061, Thermo Fisher Scientific, США), 50 ед./мл раствора пенициллин-стрептомицина (15140122, Thermo Fisher Scientific, США) и 10 мкМ ROCK inhibitor (ab120129, abcam, США) [12].

На последующих этапах протокола дифференцировки в среду XF-KO-SR дополнительно вносили 50 нг/мл Noggin4 (PSG100-10, SciStore, Россия), 50 нг/мл bFGF (PSG060-10, SciStore, Россия) и затем 25 нг/мл BMP4 (PCH9534, Thermo Fisher Scientific, США).

Среда hCEpCs (Human Corneal Epithelial Cells media) включала в себя DMEM/F12 (C470п, «ПанЭко», Россия) с 10% KnockOut SR XenoFree CTS (12618012, Thermo Fisher Scientific, США), 2 mM GlutaMAX (35050061, Thermo Fisher Scientific, США), 10 мкМ ROCK inhibitor (ab120129, abcam, США), 0,4 мкг/мл Hydrocortisone (H0888, Sigma-Aldrich, США), 5 мкг/мл Insulin (Ф062, «ПанЭко», Россия), 1,4 нг/мл 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (100-0548, STEMCELL Technologies Inc, Канада), 24 мкг/мл Аденин сульфат (A0013500100, SUVCHEM, Индия), 10 мкМ Forskolin (F6886, Sigma-Aldrich, США), 10 нг/мл EGF (PSG130, SciStore, Россия), 10 нг/мл KGF (PSG230-10, SciStore, Россия) и 50 ед./мл раствора пенициллин-стрептомицина (15140122, Thermo Fisher Scientific, США) [13].

Состав указанных сред был разработан на основании приведенных литературных источников с частичными модификациями в связи с недоступностью ряда компонентов. Замену производили исходя из аналогичных механизмов воздействия веществ по литературным данным.

Фотографии цельных органоидов были получены с использованием стереомикроскопа Leica M205.

Гистологическое исследование

Органоиды фиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина (00020709, Histoline, Россия) в течение 30 мин, отмывали от фиксатора в DPBS (P060п-1, «ПанЭко», Россия), инкубировали по 1 ч в растворах сахарозы (170764, «Ленреактив», Россия) в DPBS с последовательным увеличением концентрации (10–20–30%) для предотвращения сильной деформации органоидов. Затем органоиды максимально осушили от раствора и заморозили в жидком азоте в Tissue-Tek O.C.T. Compound (4583, Electron Microscopy Sciences, США).

Срезы толщиной 10 мкм получили при помощи Thermo Scientific Microm HM 525 Cryostat, высушили, дополнительно зафиксировали в 10%-м растворе забуференного формалина (00020709, Histoline, Россия) в течение 15 мин при комнатной температуре, затем отмывали в DPBS трижды в течение 5 мин, после чего последовательно инкубировали 30 мин в 1%-м растворе перекиси водорода (153142, «Ленреактив», Россия) в DPBS и 30 мин в 2,5%-м растворе BSA (A7906, Sigma-Aldrich, США) в DPBS.

Иммуногистохимия

Для последующего иммуногистохимического окрашивания срезы инкубировали ночь при +4 °С с первичными

антителами к кератину 3 (PAA490Hu01, CLOUD-CLONE, США) и коллагену 7 (pA5-18390, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), разведенными 1 : 100 и 1 : 300 соответственно, в блок-растворе DPBS с 2% BSA (A7906, Sigma-Aldrich, США), 1% Triton X100 (1001776062, Sigma-Aldrich, США) и 1% Tween 20 (P7949, Sigma-Aldrich, США). На следующий день срезы отмывали в DPBS и инкубировали ночь при +4 °С со вторичными антителами к IgG кролика, конъюгированными с Alexa594 (A11012, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), и IgG козы с Alexa488 (A32814, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), разведенными 1:1000 в блок-растворе. На следующий день срезы отмывали в DPBS и заключили в среде с защитой от выцветания VectaSHIELD Antifade с DAPI (H-1200-10, Vector Laboratories, США).

Срезы были проанализированы с помощью прямого микроскопа Nikon Eclipse Ni с DS-Ri2 (Nikon Corporation, Япония) и серии изображений были получены с использованием набора оптических фильтров этого микроскопа для детекции эмиссии флуоресценции, изображения были обработаны с помощью пакета программ ImageJ (США) для получения микрофотографий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Формирование исходных ЭТ проходило в два этапа (рис. 1). На первом этапе с Д(-12) в условиях адгезионной культуры происходило формирование колоний иПСК, которые затем приводили в неадгезивную форму (Д(-7)). Через 7 суток культивирования в неадгезивных условиях происходило созревание ЭТ, колонии приобретали более округлую форму с гладкими краями, после чего переходили к протоколу дифференцировки в эпителиальные клетки роговицы (Д(1)).

С 8 дня протокола дифференцировки в среду XF-KO-SR вводили Noggin4 и bFGF — факторы, блокирующие TGFβ- и Wnt-сигналинг и активирующие FGF-сигналинг для индукции эктодермальной дифференцировки. Дополнительно вводили BMP4, поскольку было показано, что BMP4 способствует дифференцировке иПСК в эпителиальные клетки роговицы [14].

На 13-й день начали поэтапно заменять среду XF-KO-SR на среду для культивирования клеток эпителия роговицы человека (hCEpCs).

К 22-м суткам среди органоидов наблюдались как моноосферы (рис. 2А), так и комплексные образования, сформированные, вероятнее всего, несколькими агрегировавшими ЭТ (рис. 2Б, В). Большая часть органоидов становилась оптически полупрозрачной в проходящем свете, однако у ряда объектов наблюдали пигментированные участки (рис. 2).

Для анализа паттернов экспрессии маркеров дифференцировки были получены криосрезы

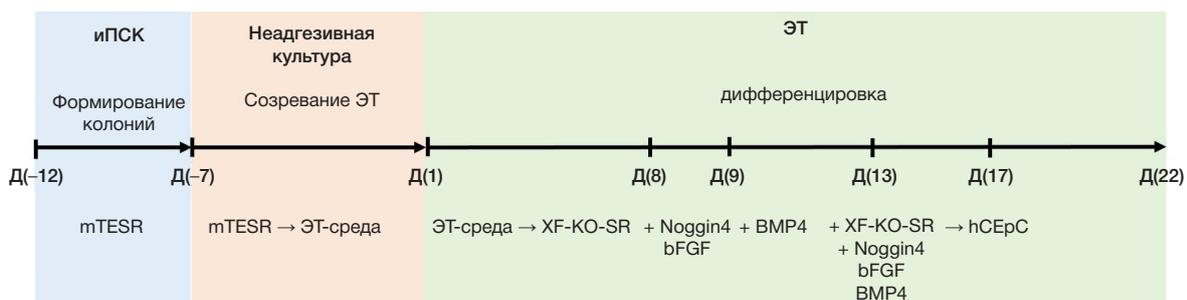


Рис. 1. Протокол получения ЭТ и последующей дифференцировки в эпителиальные клетки роговицы. Д(-12) — начало эксперимента; Д(1) — первый день протокола дифференцировки; Д(22) — последний день дифференцировки, сбор органоидов для последующего анализа

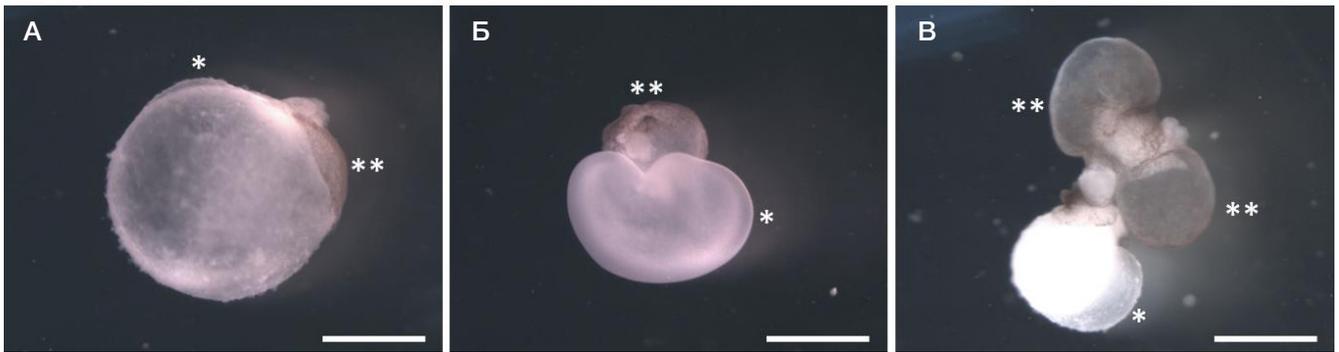


Рис. 2. Темнопольная фотография органоидов на 22-е сутки дифференцировки. Помимо полупрозрачных сфер наблюдаются пигментированные участки органоидов. * — полупрозрачные области на периферии органоида, предположительно участки роговицы; ** — пигментированные области органоида, предположительно соответствующие органоидам пигментного эпителия сетчатки. Масштабный отрезок — 1 мм

сформированных органоидов и проанализированы при помощи иммуногистохимии. Для оценки уровня экспрессии биомаркеров роговицы и конъюнктивы используется иммуноцитохимический анализ на кератины 3, 7 и 19, поскольку в обширном исследовании было показано, что эпителий роговицы в 100% случаев положительно окрашивается на любой из данных маркеров [15].

Эпителий роговицы поддерживается комплексом базальной мембраны, который прикрепляет эпителий к боуеновой мембране посредством сложной сетки из прикрепляющих фибрилл (состоящих из коллагена типа VII) и прикрепляющих бляшек (коллаген типа VI), эти структуры взаимодействуют с плотной пластинкой и коллагеновыми фибриллами боуенова слоя [16].

На рис. 3 представлены фотографии срезов органоидов, представляющих из себя сферу с полупрозрачным содержимым, окаймленным клеточными слоями, с положительным окрашиванием на маркеры эпителиальной дифференцировки (кератин 3) и базальной мембраны (коллаген 7). Клетки, положительно окрашенные на кератин 3, наблюдали на периферии во внешнем клеточном слое органоида. Экспрессия коллагена 7 обнаружена в подлежащих клеточных слоях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Трансплантация роговицы является примером наиболее успешной трансплантации органов человека. Успех и высокая

частота применения ортотопических аллотрансплантатов роговицы как у людей, так и у экспериментальных животных, связаны с феноменом «иммунной привилегии» глаза, ассоциированным с естественным процессом подавления воспалительных процессов для сохранения функции зрения. В настоящее время считается, что три основных механизма обеспечивают иммунную привилегию при трансплантации роговицы: 1) анатомические, клеточные и молекулярные барьеры в роговице; 2) толерантность, связанная с присутствием регуляторных Т-клеток и иммунными отклонениями в передней камере глаза; 3) иммуносупрессорное внутриглазное микроокружение [17].

Мы описываем протокол дифференцировки функционального эпителия роговицы из ИПСК человека *in vitro*. При соблюдении этого протокола часть клеток спонтанно образует круглые колонии, сфероиды или эмбриоидные тельца, которые в ходе последовательных стадий дифференцировочного процесса, при котором постепенно меняют культуральную среду и добавляют факторы роста и ингибиторы каскада WNT, постепенно приобретают свойства органоида глаза. Основу нашему протоколу дало использование методики, описанной в статье Isla-Magrané, в которую был внесен ряд изменений [18]. В данной работе использована также трехмерная модель дифференцировки с вынужденной агрегацией ЭТ при культивировании в условиях предотвращающих адгезию клеток к поверхности пластика. К преимуществам данного протокола можно

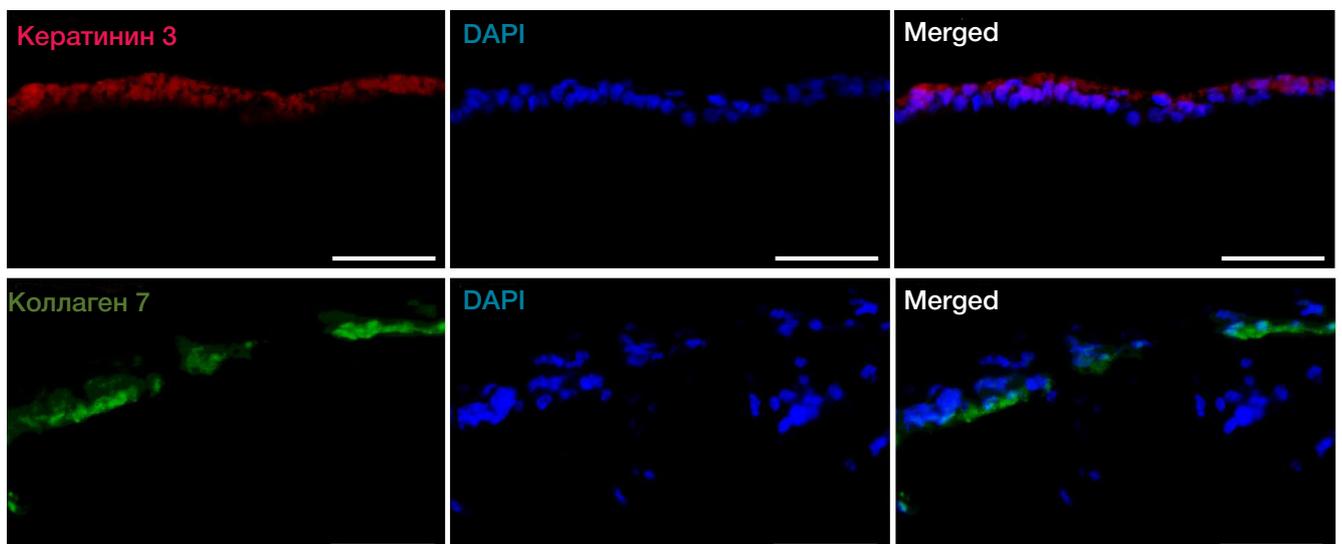


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание криосрезов органоидов на 22-е сутки дифференцировки. Реакция с антителами к кератину 3 (красный цвет) и реакция с антителами к коллагену 7 (зеленый цвет). Ядра дополнительно окрашены DAPI. Масштабный отрезок — 50 мкм

отнести возможность сокультивирования клеток различных типов, и получение одиночных трехмерных моделей, размер которых можно контролировать [19]. Агрегация клеток и образование сфероидов происходит за счет способности клеток к межклеточной адгезии, стимулированной отсутствием адгезии клеток к культуральному пластику [20]. Опубликованный здесь протокол дифференцировки потенциально может быть полезен исследователям, интересующимся развитием глаз и/или регенерацией поверхности глаза, специалистам в области трансляционной регенеративной медицины.

Развитие методов направленной дифференцировки iPСК в ПЭС позволило использовать некоторые подходы для получения эпителия лимба и роговицы. Для получения клеток ПЭС из iPСК используют малые молекулы, ингибиторы WNT/ β -катенин каскада или рекомбинантные белки и факторы [22, 23].

При дифференцировке колоний iPСК в адгезивных условиях постепенно формируются концентрические зоны — SEAM (self-earned autonomous multi-zone), клетки в которых начинают приобретать различную морфологию и специфический набор маркеров. Отметим преимущество такого протокола: при таком культивировании клетки одного типа могут быть выделены механическим способом и последующей проточной цитофлуориметрией в популяцию клеток-предшественников, подобных эпителию лимба. Клетки этого типа можно размножить и дифференцировать с образованием эпителиального слоя, экспрессирующего маркеры кератина 3 и 12, PAX6. Исследователи подтвердили функциональность полученных клеток на модели на животных эпителиальной дисфункции роговицы после хирургической ксенотрансплантации. В 2024 г. опубликованы результаты первых успешных клинических исследований по аллогенной трансплантации эпителиальных клеток роговицы, дифференцированных из iPСК по SEAM-протоколу, четырем пациентам. Два пациента страдали синдромом лимбальной недостаточности, один — пемфигоидом слизистой оболочки глаза и один — токсическим эпидермальным некрозом [24]. Во всех случаях после 52 недель наблюдения было отмечено улучшение состояния глаз, увеличение остроты зрения, а также уменьшение помутнения роговицы. Дефекты эпителия роговицы, субъэпителиальные симптомы, показатели качества жизни и неоваскуляризация роговицы в основном улучшились или остались без изменений. Никаких серьезных нежелательных явлений, таких как опухольобразование

или клиническое отторжение, не обнаружено в течение всего периода наблюдения.

Получение органоида глаза из iPСК с помощью разработанного протокола позволило детектировать экспрессию коллагена 7 в области, прилегающей к базальной мембране. Прикрепляющие фибриллы, образуемые коллагеном 7, являются важным структурным элементом, поддерживающим интегральную целостность ткани. Больные, страдающие наследственными нарушениями в экспрессии коллагена 7 (РДБЭ), инвалидизируются с детства за счет хронического воспаления кожи и эпителиальной выстилки внутренних органов. Применяемые в настоящее время клинические методы лечения офтальмологических проявлений, включая использование контактных линз, смазок и антибиотиков для уменьшения симптомов, не предлагают решения для предотвращения образования рубцов на роговице [10].

Для клеточной терапии в таких случаях могут быть применимы аллогенные трансплантации эпителия лимба и роговицы, дифференцированные из iPСК здоровых доноров. Создание банков стволовых клеток с линиями гомозиготных клеток по лейкоцитарному антигену человека (HLA) может обеспечить эффективный и экономически выгодный ресурс для терапии нового типа.

Аутологичное лечение на основе iPСК может быть непомерно дорогостоящим и трудоемким, однако использование пациент-специфических iPСК (РДБЭ-iPСК) и их дифференцировки в органоид глаза создает модели заболевания для тестирования новых лекарств и применения методов генной терапии.

Выводы

Данное исследование описывает протокол получения органоида глаза с сформированным эпителием роговицы путем дифференцировки iPСК. Разработка различных методов получения эпителиальных тканей роговицы и лимба способствует развитию регенеративной медицины в офтальмологии. Хотя единый тип трансплантата роговицы вряд ли станет универсальным решением, сочетание различных подходов может способствовать решению проблемы нехватки донорских роговиц, помочь в разработке биоинженерных матриц, которые можно имплантировать с клетками или без них для стимуляции восстановления и регенерации тканей, а также помочь в разработке методов лечения заболеваний, которые невозможно вылечить с помощью доступных в настоящее время методов.

Литература

1. Porth JM, Deiotte E, Dunn M, Bashshur R. A Review of the Literature on the Global Epidemiology of Corneal Blindness. *Cornea*. 2019; 38 (12): 1602–9.
2. Gain P, Jullienne R, He Z, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016; 134 (2): 167–73.
3. Hernández J, Panadero-Medianero C, Arrázola MS, Ahumada M. Mimicking the Physicochemical Properties of the Cornea: A Low-Cost Approximation Using Highly Available Biopolymers. *Polymers (Basel)*. 2024; 16 (8): 1118.
4. Griffith M, Polissetti N, Kuffova L, Gallar J, Forrester J, Vemuganti GK, Fuchsluger TA. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. *Ocul Surf*. 2012; 10 (3): 170–83.
5. Ludwig PE, Lopez MJ, Czyz CN. Embryology, Eye Malformations. [Updated 2023 Apr 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan [cited 2025 Nov 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482496/#>.
6. Hirami Y, Mandai M, Sugita S, Maeda A, Maeda T, Yamamoto M, et al. Safety and stable survival of stem-cell-derived retinal organoid for 2 years in patients with retinitis pigmentosa. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (12): 1585–1596.
7. Hirayama M, Hatou S, Nomura M, Hokama R, Hirayama OI, Inagaki E, et al. A first-in-human clinical study of an allogenic iPSC-derived corneal endothelial cell substitute transplantation for bullous keratopathy. *Cell Rep Med*. 2025; 6 (1): 101847.
8. Харитонов А. Е., Сурдина А. В., Лебедева О. С., Богомазова А. Н., Лагарькова М. А. Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного

- пигментного эпителия сетчатки глаза. *Acta Naturae*. 2018; 10 (3): 30–39.
9. Chandran C, Santra M, Rubin E, Geary ML, Yam GH. Regenerative Therapy for Corneal Scarring Disorders. *Biomedicines*. 2024; 12 (3): 649.
 10. Tong L, Hodgkins PR, Denyer J, Brosnahan D, Harper J, Russell-Eggitt I, et al. The eye in epidermolysis bullosa. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83 (3) :323–6.
 11. Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e45435.
 12. Hongisto H, Ilmarinen T, Vattulainen M, Mikhailova A, Skottman H. Xeno- and feeder-free differentiation of human pluripotent stem cells to two distinct ocular epithelial cell types using simple modifications of one method. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 291.
 13. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*. 2007; 25 (5): 1145–55.
 14. Lee HS, Mok J, Joo CK. Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) enhances the differentiation of human induced pluripotent stem cells into limbal progenitor cells. *Curr Issues Mol Biol*. 2021; 43 (3): 2124–34.
 15. Poli M, Burillon C, Auxenfans C, Rovere MR, Damour O. Immunocytochemical Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency: Comparative Analysis of Current Corneal and Conjunctival Biomarkers. *Cornea*. 2015; 34 (7): 817–23.
 16. Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F, Pearlman E, editors. *The Eye*. 2016; p. 1–102.
 17. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res*. 2019; 72: 100758.
 18. Isla-Magrané H, Veiga A, García-Arumí J, Duarri A. Multicellular organoids from human induced pluripotent stem cells displayed retinal, corneal, and retinal pigment epithelium lineages. *Stem Cell Res Ther*. 2021; 12 (1): 581.
 19. Chen X, Sun G, Tian E, Zhang M, Davtyan H, Beach TG, et al. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Adv Sci (Weinh)*. 2021; 8 (18): e2101462.
 20. Sakalem ME, De Sibio MT, da Costa FADS, de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. *Biotechnol J*. 2021; 16 (5): e2000463.
 21. Maliszewska-Olejniczak K, Brodaczewska KK, Bielecka ZF, Solarek W, Kornakiewicz A, Szczylak C, Porta C, et al. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology*. 2019; 71 (1): 149–63.
 22. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2 (5): 384–93.
 23. Zhu J, Reynolds J, Garcia T, Cifuentes H, Chew S, Zeng X, et al. Generation of Transplantable Retinal Photoreceptors from a Current Good Manufacturing Practice-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cell Line. *Stem Cells Transl Med*. 2018; 7 (2): 210–19.
 24. Soma T, Oie Y, Takayanagi H, Matsubara S, Yamada T, Nomura M, Yoshinaga Y, et al. Induced pluripotent stem-cell-derived corneal epithelium for transplant surgery: a single-arm, open-label, first-in-human interventional study in Japan. *Lancet*. 2024; 404 (10466): 1929–39.

References

1. Porth JM, Deiotte E, Dunn M, Bashshur R. A Review of the Literature on the Global Epidemiology of Corneal Blindness. *Cornea*. 2019; 38 (12): 1602–9.
2. Gain P, Jullienne R, He Z, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016; 134 (2): 167–73.
3. Hernández J, Panadero-Medianero C, Arrázola MS, Ahumada M. Mimicking the Physicochemical Properties of the Cornea: A Low-Cost Approximation Using Highly Available Biopolymers. *Polymers (Basel)*. 2024; 16 (8): 1118.
4. Griffith M, Poliseti N, Kuffova L, Gallar J, Forrester J, Vemuganti GK, Fuchsluger TA. Regenerative approaches as alternatives to donor allografting for restoration of corneal function. *Ocul Surf*. 2012; 10 (3): 170–83.
5. Ludwig PE, Lopez MJ, Czyz CN. Embryology, Eye Malformations. [Updated 2023 Apr 3]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan [cited 2025 Nov 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482496/#>.
6. Hiram Y, Mandai M, Sugita S, Maeda A, Maeda T, Yamamoto M, et al. Safety and stable survival of stem-cell-derived retinal organoid for 2 years in patients with retinitis pigmentosa. *Cell Stem Cell*. 2023; 30 (12): 1585–1596.
7. Hirayama M, Hatou S, Nomura M, Hokama R, Hirayama OI, Inagaki E, et al. A first-in-human clinical study of an allogenic iPSC-derived corneal endothelial cell substitute transplantation for bullous keratopathy. *Cell Rep Med*. 2025; 6 (1): 101847.
8. Haritonov AE, Surdina AV, Lebedeva OS, Bogomazova AN, Lagarkova MA. Vozmozhnosti ispol'zovaniya plyuripotentnyh stvolovykh kletok dlya vosstanovleniya povrezhdennogo pigmentnogo epiteliya setchatki glaza. *Acta Naturae*. 2018; 10 (3): 30–39. Russian.
9. Chandran C, Santra M, Rubin E, Geary ML, Yam GH. Regenerative Therapy for Corneal Scarring Disorders. *Biomedicines*. 2024; 12 (3): 649.
10. Tong L, Hodgkins PR, Denyer J, Brosnahan D, Harper J, Russell-Eggitt I, et al. The eye in epidermolysis bullosa. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83 (3) :323–6.
11. Hayashi R, Ishikawa Y, Ito M, Kageyama T, Takashiba K, Fujioka T, et al. Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS One*. 2012; 7 (9): e45435.
12. Hongisto H, Ilmarinen T, Vattulainen M, Mikhailova A, Skottman H. Xeno- and feeder-free differentiation of human pluripotent stem cells to two distinct ocular epithelial cell types using simple modifications of one method. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 291.
13. Ahmad S, Stewart R, Yung S, Kolli S, Armstrong L, Stojkovic M, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells*. 2007; 25 (5): 1145–55.
14. Lee HS, Mok J, Joo CK. Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) enhances the differentiation of human induced pluripotent stem cells into limbal progenitor cells. *Curr Issues Mol Biol*. 2021; 43 (3): 2124–34.
15. Poli M, Burillon C, Auxenfans C, Rovere MR, Damour O. Immunocytochemical Diagnosis of Limbal Stem Cell Deficiency: Comparative Analysis of Current Corneal and Conjunctival Biomarkers. *Cornea*. 2015; 34 (7): 817–23.
16. Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F, Pearlman E, editors. *The Eye*. 2016; p. 1–102.
17. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res*. 2019; 72: 100758.
18. Isla-Magrané H, Veiga A, García-Arumí J, Duarri A. Multicellular organoids from human induced pluripotent stem cells displayed retinal, corneal, and retinal pigment epithelium lineages. *Stem Cell Res Ther*. 2021; 12 (1): 581.
19. Chen X, Sun G, Tian E, Zhang M, Davtyan H, Beach TG, et al. Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Adv Sci (Weinh)*. 2021; 8 (18): e2101462.
20. Sakalem ME, De Sibio MT, da Costa FADS, de Oliveira M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities

- of use in life sciences and medicine. *Biotechnol J.* 2021; 16 (5): e2000463.
21. Maliszewska-Olejniczak K, Brodaczewska KK, Bielecka ZF, Solarek W, Kornakiewicz A, Szczylik C, Porta C, et al. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology.* 2019; 71 (1): 149–63.
 22. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2 (5): 384–93.
 23. Zhu J, Reynolds J, Garcia T, Cifuentes H, Chew S, Zeng X, et al. Generation of Transplantable Retinal Photoreceptors from a Current Good Manufacturing Practice-Manufactured Human Induced Pluripotent Stem Cell Line. *Stem Cells Transl Med.* 2018; 7 (2): 210–19.
 24. Soma T, Oie Y, Takayanagi H, Matsubara S, Yamada T, Nomura M, Yoshinaga Y, et al. Induced pluripotent stem-cell-derived corneal epithelium for transplant surgery: a single-arm, open-label, first-in-human interventional study in Japan. *Lancet.* 2024; 404 (10466): 1929–39.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ КОСТНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ DLP-3D-ПЕЧАТИ

А. Р. Билялов ✉, С. С. Чугунов, И. Ш. Ахатов, А. А. Тихонов, О. Р. Шангина, В. Н. Павлов, К. В. Данилко, М. Ф. Галаутдинов, В. Н. Акбашев
Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

Использование аллогенного костного материала как керамического наполнителя для DLP-печати позволяет получать индивидуализированные имплантаты сложной формы, совмещающие биомиметичную природу матрицы с преимуществами аддитивных технологий. Целью работы было оценить возможность использования прокаленного порошка кортикального костного аллотрансплантата в составе фотополимеризуемой суспензии для DLP-печати и получения после спекания биокерамики с характеристиками, сопоставимыми с синтетическим гидроксиапатитом. Костный аллотрансплантат подвергали многоэтапной специализированной обработке с полным удалением клеток при сохранении структуры межклеточного матрикса и коллагеновых волокон. Прокаленный медицинский аллотрансплантат измельчали, вводили в фотополимеризуемую матрицу и использовали для DLP-печати образцов, которые затем спекали и анализировали методами рентгеновской дифракции и энергодисперсионной спектроскопии до и после аддитивного производства. Относительная плотность спеченного материала составила 81,5%, прочность на сжатие — 75,8 МПа, прочность на растяжение — 12 МПа, модуль Юнга — 3,08 ГПа и твердость по Виккерсу — 0,55 ГПа, что находится в диапазоне значений для пористого гидроксиапатита. Фазовый и элементный состав образцов после DLP-печати и спекания не претерпевал существенных изменений по сравнению с исходным прокаленным материалом. Прокаленный порошок костного аллотрансплантата пригоден для приготовления фотополимеризуемых суспензий и последующей DLP-печати керамических образцов без ухудшения фазовой и химической стабильности материала. Полученные механические свойства позволяют рассматривать данный аллогенный костный материал в качестве перспективного кандидата для изготовления индивидуализированных имплантатов сложной геометрии.

Ключевые слова: гидроксиапатит, 3D-печать, биокерамика, аллогraft, аллоплант, биомедицинское применение, обжиг, керамика

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-15-20042.

Вклад авторов: А. Р. Билялов, С. С. Чугунов — планирование исследования, анализ литературы, интерпретация данных, подготовка рукописи; И. Ш. Ахатов — планирование исследования, интерпретация данных, подготовка рукописи; А. А. Тихонов — планирование исследования, анализ литературы, сбор, анализ, интерпретация данных; О. Р. Шангина — планирование исследования, анализ, интерпретация данных; В. Н. Павлов — планирование исследования; К. В. Данилко — планирование исследования, сбор, анализ, интерпретация данных; М. Ф. Галаутдинов — сбор данных; В. Н. Акбашев — анализ литературы.

✉ **Для корреспонденции:** Азат Ринатович Билялов
ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Россия; azat.bilyalov@gmail.com

Статья получена: 03.11.2025 **Статья принята к печати:** 29.11.2025 **Опубликована онлайн:** 18.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.068

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/>).

DEVELOPMENT AND ASSESSMENT OF THE BONE ALLOGRAFT-BASED MATERIAL FOR DLP 3D PRINTING

Bilyalov AR ✉, Chugunov SS, Akhatov ISH, Tikhonov AA, Shangina OR, Pavlov VN, Danilko KV, Galautdinov MF, Akbashev VN
Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

The use of allogenic bone material as a ceramic filler for DLP printing makes it possible to obtain personalized complex-shaped implants combining the matrix biomimetic nature with the additive technology benefits. The study aimed to assess the possibility of using the calcined cortical bone allograft powder as part of photopolymerizable suspension for DLP printing and producing bioceramics with the characteristics comparable to that of synthetic hydroxyapatite by sintering. The bone allograft was subjected to multi-stage specialized treatment involving complete removal of cells with preservation of the intercellular matrix and collagen fiber structure. The calcined medical allograft was crushed, introduced into a photopolymerizable matrix, and used for DLP printing of the samples that were further sintered and analyzed by X-ray diffraction and energy-dispersive spectroscopy methods before and after additive production. The sintered material specific gravity was 81.5%, compressive strength — 75.8 MPa, tensile strength — 12 MPa, Young's modulus — 3.08 GPa, and Vickers hardness — 0.55 GPa, which was within the range of values for porous hydroxyapatite. After DLP printing and sintering the sample phase and elemental composition did not change considerably compared to the source calcined material. The calcined bone allograft powder is suitable for preparing photopolymerizable suspensions and subsequent DLP printing of ceramic samples without deteriorating the material phase and chemical stability. The resulting mechanical properties make it possible to consider this allogenic bone material as a promising candidate for production of personalized implants with sophisticated geometry.

Keywords: hydroxyapatite, 3D printing, bioceramics, allograft, alloplant, biomedical application, firing, ceramics

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-15-20042.

Author contribution: Bilyalov AR, Chugunov SS — study planning, literature review, data interpretation, manuscript writing; Akhatov ISH — study planning, data interpretation, manuscript writing; Tikhonov AA — study planning, literature review, data acquisition, analysis, and interpretation; Shangina OR — study planning, data analysis and interpretation; Pavlov VN — study planning; Danilko KV — study planning, data acquisition, analysis, and interpretation; Galautdinov MF — data acquisition; Akbashev VN — literature review.

✉ **Correspondence should be addressed:** Azat R. Bilyalov
Lenina, 3, Ufa, 450008, Russia; azat.bilyalov@gmail.com

Received: 03.11.2025 **Accepted:** 29.11.2025 **Published online:** 18.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.068

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/>).

К 2023 г. ежегодное количество травматолого-ортопедических хирургических операций в России превысило 1,2 млн. Наиболее востребованные методы лечения включают использование ортопедического костного цемента и пластических материалов для лечения травм костей. В сфере ортобиологических процедур наибольшая доля в 2022 г. приходилась на костные трансплантаты и заменители [1].

Аутоотрансплантаты широко распространены как эффективные имплантаты для замещения костных дефектов [2], особенно в ортопедических и стоматологических операциях. Полученные от пациента, обычно из подвздошного гребня, аутоотрансплантаты обладают высокой биосовместимостью, низким риском отторжения и значительным остеогенным потенциалом [3]. При оценке преимуществ и недостатков аутоотрансплантатов аллотрансплантаты оказываются многообещающей альтернативой [4]. Полученные от доноров, часто кадаверных, аллотрансплантаты устраняют необходимость в дополнительной хирургической агрессии, что снижает риск осложнений. Использование аллотрансплантатов кроме того может сократить как хирургическое, так и анестезиологическое время, поскольку необходимость в дополнительном хирургическом вмешательстве устраняется. Кроме того, размер и форму аллотрансплантатов можно изменить под область имплантации задолго до операции на этапе предоперационного планирования.

Однако аллотрансплантаты не лишены недостатков. На практике проблемой при использовании аллотрансплантатов является сложность объемного формирования костных блоков для соответствия размерам костного дефекта [5].

Важность применения технологии DLP-печати керамики в медицине обусловлена возможностью создания сложных по форме и функциональных биосовместимых изделий для имплантатов и реконструктивной хирургии. DLP предлагает высокое разрешение и точность обработки, что критично для изделий из биоинертных или биоактивных керамических материалов. Это позволяет создавать пористые структуры, имитирующие костную ткань, способствующие остеоинтеграции и восстанавливающие биологическую функцию [6].

Традиционные методы производства керамики затруднены из-за сложности обработки и формования, тогда как DLP-печать позволяет добиться сложных геометрических форм без значительных затрат времени и материалов. Современные исследования также отмечают важность оптимизации реологических свойств фотополимерных суспензий для успешной печати и достижения требуемых механических характеристик изделий [7].

Используемые в DLP керамические материалы, такие как гидроксипатит, оксид алюминия и оксид циркония, обладают отличной биосовместимостью и биоинертностью, что снижает риски отторжения и воспалительных реакций у пациентов. Технология позволяет контролировать микроструктуру поверхности, что улучшает сцепление имплантата с тканями [6].

DLP-печать хорошо сочетается с другими методами аддитивного производства и постобработки, что расширяет возможности по созданию multifunctionальных и композитных материалов для медицины [8].

В данной работе исследуется применимость метода аддитивного производства на основе цифровой обработки света (DLP) к гидроксипатитовому материалу, полученному из кортикальных костей кадаверного костного аллотрансплантата. Насколько нам известно, до

настоящего времени в литературе не было представлено ни одного исследования, специально посвященного аддитивному производству керамических изделий с использованием костных аллогraftов человека.

Материал, используемый в данном исследовании, представляет собой коммерчески доступный медицинский костный аллотрансплантат в форме блоков (аллотрансплантаты для хирургии «Аллоплант»® по ТУ 9398-001-04537642-2011; регистрационное удостоверение на медицинское изделие ФСР 2011/12012; производитель — ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, Россия). Этот коммерческий материал широко используют в медицинской практике, и ежегодно в медицинских клиниках проводится более 2000 ортопедических операций.

Исследование инициировано в ответ на запросы практикующих хирургов о разработке передовых технологий формирования аллотрансплантатов. Основная цель применения данного аллотрансплантатного материала в технологии 3D-печати заключается в достижении высокой точности геометрических параметров с отклонениями в пределах сотен микрон, что позволяет адаптировать изделия к неправильной форме костных дефектов при сохранении высоких биомедицинских свойств.

Цель исследования — оценить применимость технологии аддитивного производства на основе цифровой обработки света (DLP) для формирования высокоточных по геометрии имплантатов сложной формы из материала на основе костного аллогraftа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обработка аллотрансплантационного материала и приготовление фотополимеризующейся суспензии

Кадаверный костный материал проходит ряд процедур химической обработки и радиационной стерилизации для устранения иммуногенных компонентов и индукции лизиса мембранных тканей, при этом сохраняются коллаген и некоторые элементы аморфного костного матрикса [9]. Схема проведения исследования представлена на рис. 1.

Костные блоки размером 0,5–6 см подвергали прокаливанию в лабораторной печи Kittec CLL15 (Kittec, Германия) при температуре 900 °С в течение 5 ч для устранения органического содержимого. Примерно 15% прокаленных блоков имели желтоватые и сероватые отложения на поверхности. Как чистые прокаленные блоки, так и блоки с отложениями анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа Jeol JSM-6390LV (JEOL, Япония), оснащенного энергодисперсионным рентгеновским анализатором (EX-230 BU).

После прокалывания материал аллотрансплантата подвергали двухэтапной процедуре измельчения с использованием циркониевых измельчительных стаканов и циркониевых шаров в шаровой мельнице Retsch PM400 (Retsch, Германия). Целью первого этапа было измельчить блоки аллотрансплантата в порошок миллиметрового размера. Второй этап был направлен на измельчение до размера частиц 1–5 мкм. Такое измельчение включало мокрое измельчение в изопропанол (ИПА). Затем измельченный материал сушили в сушильной печи Binder ED56 (Binder GmbH, Германия) при 115 °С в течение 2 ч для удаления остатков ИПА.

После первого этапа измельчения была получена фракция порошка с использованием лабораторных сит с размером ячеек 400 мкм и 315 мкм. «Образец А» состоял из фракции

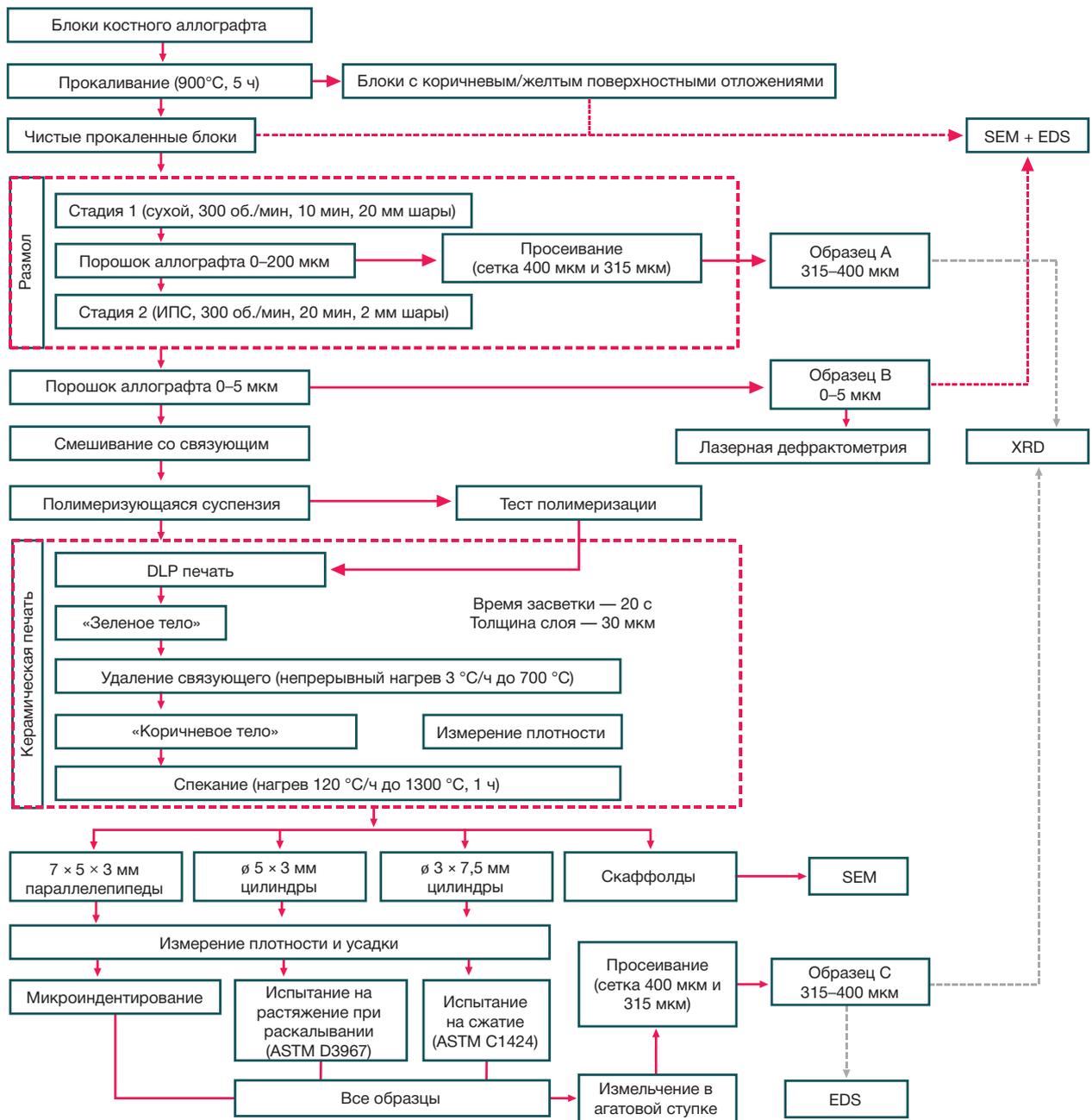


Рис. 1. Схема проведения исследования

порошка в диапазоне от 315 до 400 мкм. После второго этапа измельчения из полученного порошка был собран «образец В».

Порошок аллотрансплантата микронного размера смешивали с диспергатором Dysperbyk-180 (BYK GmbH, Германия) в массовой концентрации 2% в шаровой мельнице Retsch PM400 с использованием 8-миллиметровых циркониевых шаров со скоростью 200 об./мин в течение 1 ч. Для создания фотополимеризующей суспензии органическое связующее вещество CB2-DLP-GM/2 (ООО «ВундерТех», Россия) смешивали с красителем E104 в массовой концентрации 0,24% и затем добавляли к диспергированному порошку аллотрансплантата для достижения загрузки порошка в массовой концентрации 68,9%, что соответствовало объемной концентрации 42,6%. Включение красителя было предназначено для минимизации рассеяния света керамическими частицами в процессе 3D-печати. Наконец, суспензию

гомогенизировали в шаровой мельнице Retsch PM400 с использованием циркониевых шаров диаметром 20 мм при скорости 200 об./мин в течение 5 ч.

Испытания фотополимеризующей суспензии и операций 3D-печати

Все исследования с применением фотополимеризующей суспензии проводили с использованием 3D-принтера Creality Mage Pro 8K DLP (Creality, Китай).

Первоначально оценивали эффективность полимеризации суспензии. Квадратные объекты размером 1 × 1 см полимеризовались при различной энергии света 0,12, 0,2, 0,24, 0,8 и 16 Дж/см², что соответствовало времени экспозиции 15, 25, 30, 100 и 2000 с соответственно. В каждом случае слой суспензии толщиной 2 мм помещали в ванну принтера, и эксперимент повторялся четыре раза. После полимеризации толщину полимеризованного

слоя измеряли с помощью толщиномера Interapid (Schut, Швейцария) с точностью 0,001 мм. Эта оценка дала два важных результата: а) подтверждение пригодности суспензии на основе аллотрансплантата для печати на основе DLP; б) установление связи между энергией света и глубиной полимеризации.

На основании этой зависимости были определены оптимальные параметры 3D-печати, а именно время экспозиции 20 с и толщина слоя 30 мкм. Процесс 3D-печати проводили в две серии. Первая серия — изготовление цилиндров с размерами 3 × 7,5 мм для проведения механических испытаний на сжатие (ASTM C1424) [10] и рентгеновскую дифракцию (ISO 10993-14) [11], и параллелепипеды размером 7 × 5 × 3 мм для измерения плотности, усадки при спекании, пористости, твердости по Виккерсу (ISO 10993-14).

Вторая серия — оценка возможности печати сложной керамической структуры в виде сетки или скаффолда. После 3D-печати все объекты были подвергнуты термическому удалению связующего в печи Kirtes CLL15, путем нагревания до 700 °С со скоростью 3 °С в час в воздушной атмосфере. Измерения размеров объектов проводили с помощью цифрового штангенциркуля Torax 31C628 (Group Torax, Польша) с точностью 0,02 мм, в то время как измерения массы были проведены с помощью лабораторных весов AND HR250-AZG (AD Company, Япония) с точностью 0,001 г. Эти измерения позволили достаточно точно оценить плотность и пористость образцов на этапе неспеченного изделия (сырца).

Образцы после удаления связующего (дебаундинга) показали пористость 58% и были охарактеризованы как рыхло-консолидированные и механически слабые. Они спекались в печи Kirtes CLL15 в воздушной атмосфере при температуре 1300 °С при скорости нагрева 120 °С в час с последующей выдержкой 1 ч.

После завершения испытаний физико-механических характеристик спеченного аллотрансплантатного материала предварительно раздробленные образцы, цилиндры и параллелепипеды, измельчали в агатовой ступке и просеивали для получения порошкообразной фракции 315–400 мкм. Из полученного порошка отбирали «образец С».

Лабораторная оценка свойств материалов

Оценка неспеченного аллотрансплантатного материала

Энергодисперсионную спектроскопию использовали для оценки химического состава прокаленных аллотрансплантатных блоков, в частности, на чистых участках, а также на сероватых и желтоватых поверхностных отложениях. Этот метод также применяли к «Образцу В» для оценки химического состава целевого порошкообразного материала, предназначенного для операций 3D-печати. Ожидалось, что состав «Образца В» будет отражать эффекты процессов прокалики и измельчения, включая потенциальную механическую активацию или деградацию химических соединений. Порошкообразный образец был равномерно распределен по площади 1 × 1 см держателя образца в сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) и исследован в восьми различных местах с использованием напряжения 20 кВ и времени экспозиции 120 с.

Распределение размеров частиц «Образца В» оценивали с помощью лазерного дифрактометра Fritsch Analysette 22 NanoTec (Fritsch GmbH, Идар-Оберштайн, Германия), чтобы убедиться, что большинство частиц

порошка имеют размер менее 10 мкм, в соответствии с требованиями процесса цифровой обработки света (DLP).

Оценка физико-механических свойств аддитивно изготовленного спеченного аллотрансплантатного материала

Плотность и пористость зеленых, отоженных и спеченных объектов рассчитывали на основе их измеренных размеров и массы. Измерения проводили для каждого объекта индивидуально. Размеры измеряли с помощью цифрового штангенциркуля Torax 31C628, а массу определяли с помощью весов AND HR250-AZG. Расчеты относительной плотности основывались на теоретической плотности гидроксиапатита, которая составляет 3,16 г/см³.

Коэффициенты усадки в результате термического спекания были рассчитаны путем анализа изменений размеров между зеленым и спеченным состояниями объектов. Важно отметить, что из-за анизотропной природы 3D-печати коэффициенты усадки различались в направлениях X, Y и Z.

Твердость объектов в форме параллелепипеда оценивали с помощью аналитической установки Nanovea PB1000 (Nanovea, США), оснащенной микроиндентором Виккерса. Испытания на сжатие и растяжение при раскалывании проводили с использованием двухколонной испытательной системы Instron 5969 (Instron, США). Испытания на сжатие соответствовали стандартам ASTM C1424, при этом испытываемые образцы представляли собой цилиндры размером 3 × 7,5 мм. Эти образцы были изготовлены в соответствии с главой X2 стандарта испытаний ASTM C1424 [10], но были пропорционально уменьшены в размере на 40%. Эволюция двумерного поля деформации во время нагрузки была записана с помощью системы измерения корреляции цифровых изображений (DIC) Vic-3D (Correlated Solutions Inc., США).

Параметры растяжения спеченного аллотрансплантатного материала были получены из испытаний на растяжение при раскалывании, проведенных в соответствии с ASTM D3967.

Изготовленный аддитивным способом и спеченный скаффолд был исследован на предмет потенциальных структурных артефактов с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Helios G4 PFIB ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific, США).

Оценка эволюции фазы аллотрансплантата при аддитивных производственных процессах

Исследование фазовой эволюции материала на различных этапах производственного процесса было проведено для образцов А, В и С с использованием камеры Guinier, сопряженной с рентгеновским дифрактометром Huber G670 (Huber Diffractionstechnik GmbH Co. KG, Германия). Порошкообразные образцы наносили на пленку Mylar с помощью ацетона перед переносом для тестирования. Измерения проводили с помощью изогнутого монохроматора Ge (111) и детектора с пластиной изображения с использованием CoK α 1 ($\lambda = 1,78892 \text{ \AA}$). Оцененный диапазон 2θ составлял от 4° до 100° с угловым шагом 0,01°.

Анализ результатов рентгеновской дифракции (XRD) был выполнен с использованием базы данных ICDD PDF-2 (The International Centre for Diffraction Data Powder Diffraction File-2). Результаты XRD для образцов А, В и С были

сравнены для оценки влияния измельчения материала и термической обработки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка неспеченного аллотрансплантатного материала

Прокаливание объемных образцов аллотрансплантата удаляет остаточное органическое содержимое и этанол из материала аллотрансплантата, в результате чего получается сухая, хрупкая керамическая матрица. Потеря массы при прокаливании составила 41,9%.

В нашем анализе обработанных объемных образцов аллотрансплантатов примерно 15% костных блоков показали видимые поверхностные отложения. Эти отложения включали желтоватые вещества, богатые цинком, и сероватые материалы, содержащие значительное количество углерода. Некоторые желтоватые отложения также показали следы сероватого материала. Остальные образцы выглядели чистыми и белыми, без видимых признаков отложений.

Анализ химического состава отложений с использованием EDS выявил высокие концентрации цинка, вероятно, в форме желто-коричневых кристаллов гопеита, в желтоватых отложениях (рис. 2). Анализ выявил атомы кальция, фосфора, кислорода, натрия и цинка, которые в совокупности составляли до 82% исследованной площади. Остальные 18% включали аналогичные химические компоненты вместе с дополнительными атомами углерода, возможно, указывающими на ограниченное количество сажи, образующейся при разложении органического вещества.

Значительное количество углерода, вероятно, в виде сажи, было обнаружено в сероватых отложениях. Результаты EDS показали, что в этих сероватых областях отсутствовали обнаруживаемые атомы кальция, а 84% анализируемой области также не содержали фосфора.

Анализ EDS визуально «чистых» кальцинированных образцов аллотрансплантатов выявил наличие атомов кальция, фосфора и кислорода во всех исследованных областях. До 93% этих областей все еще были покрыты тонким слоем углеродных отложений, в то время как 27% содержали атомы натрия (рис. 3). В данных EDS с поверхностей кальцинированных образцов точно определить соотношение Ca/P невозможно, поскольку при термическом разложении органическое вещество, вероятно, диффундировало через пористую структуру неорганического матрикса, вызывая неоднородное распределение элементов на поверхности.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) показала, что прокаленный аллотрансплантат состоит из плотно упакованных зерен кальций-фосфатной керамики размером 130 нм–2,2 мкм. Зерна имеют округлую морфологию, характерную для спеченной керамики.

После прокаливании органическое содержимое аллотрансплантата разложилось, что повысило хрупкость и упростило измельчение. На первом этапе прокаленную кость измельчили до порошка с частицами менее 1,2 мм, прошедшими через сито 1200 мкм. На втором этапе получен порошок с частицами 0–5 мкм. По данным лазерной дифрактометрии, размер частиц составляет 300 нм–5 мкм, среднее значение — 2,57 мкм. Вторичный пик распределения (5–25 мкм) обусловлен агломератами мелких частиц, что подтверждается СЭМ. Такие агломераты не мешают

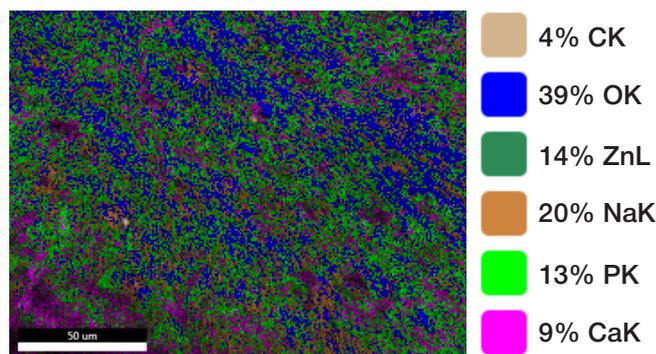


Рис. 2. Результаты анализа EDS окрашенных отложений на поверхности прокаленных аллотрансплантатов: распределение химических элементов по желтоватой области отложения, несколько цветов некоторых соединений соответствуют одному и тому же набору химических компонентов, появляющихся в результатах EDS в разном порядке, например, Ca/P/O/Na/Zn или Ca/P/O/Zn/Na

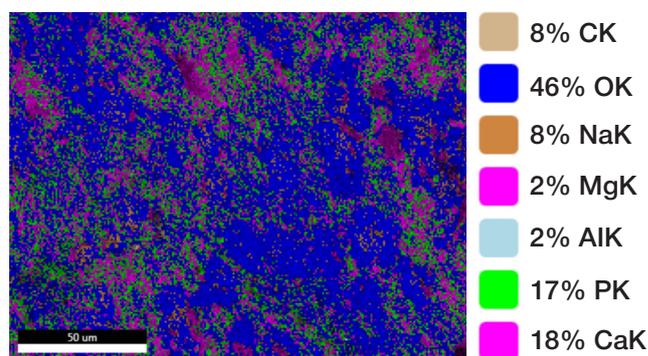


Рис. 3. Результаты EDS-анализа поверхности прокаленного аллотрансплантата, не имеющего идентифицируемых отложений, — распределение химических элементов по площади аллотрансплантата. Несколько цветов некоторых соединений соответствуют одному и тому же набору химических компонентов, появляющихся в результатах EDS в разном порядке, например, Ca/P/O/C или Ca/C/P/O

DLP-процессам, так как разрушаются при приготовлении суспензии.

Оценка физико-механических свойств аддитивно изготовленного спеченного аллотрансплантатного материала

На основе полимеризационных испытаний фотополимеризующейся суспензии установлена зависимость между световой энергией и глубиной полимеризации. По методологии Якобса [12], критическая энергия, необходимая для эффективной полимеризации, составляет $E_c = 3,51$ мДж/см², что соответствует возможностям используемого 3D-принтера. Минимальное время экспозиции, обеспечивающее полимеризацию, определено в 15 с (толщина слоя 122 мкм), однако такие образцы были мягкими и нестабильными. При экспозиции 20 с получены твердые и прочные «зеленые тела» без дефектов. Объекты простой формы и скаффолды успешно напечатаны методом DLP, очищены от связующего и спечены.

Скаффолд исследовали с помощью СЭМ (рис. 4). Слоистая структура отчетливо видна. Во время термообработки в зонах контакта выступающих структур образовались микротрещины с отверстиями около 10–15 мкм, что указывает на необходимость оптимизации спекания. Внутренние поверхности трещин содержат плотно упакованные зерна размером 5–10 мкм, тогда как исходный порошок имел зерна 0,3–5 мкм, что свидетельствует о перестройке и росте зерен при спекании.

Отсутствие нанопористых пустот в углах сопряженных зерен, характерных для высокотемпературного спекания, является примечательным. В материале отмечены межзеренные микротрещины, которые при отсутствии нанопор могут формировать пористую систему. При относительной плотности 82% ожидаемая пористость 19% согласуется с наблюдениями. Пористость обусловлена межзеренными микротрещинами и крупными пустотами между зерненными скоплениями, что типично для материалов с низкой плотностью.

Уплотнение аллотрансплантата в процессе спекания привело к уменьшению линейных размеров и геометрических особенностей. В среднем линейная усадка аллотрансплантата составила 24%. Такая анизотропная усадка характерна для 3D-печати и может быть связана с неравномерным нанесением исходного сырья как внутри, так и снаружи плоскости формирования слоя.

Результаты EDS, полученные для «образца С», дают представление о соотношении кальция и фосфора (Ca/P), поскольку они охватывают данные как с поверхности, так и с объема материала. Анализ EDS показывает, что основными компонентами спеченного аллотрансплантатного материала являются кальций (Ca), фосфор (P) и кислород (O), а также следовые количества натрия (Na), магния (Mg), стронция (Sr), алюминия (Al) и калия (K).

Соотношение Ca/P варьировалось среди восьми протестированных образцов, в диапазоне от 1,6 до 1,7.

Результаты испытаний на сжатие и растяжение при раскалывании представлены на рис. 5. Прочность на сжатие спеченного аллотрансплантатного материала варьировалась от 50 до 100 МПа, со средним значением 76 МПа. Прочность на растяжение, полученная из испытания на растяжение при раскалывании, варьировалась от 4 до 23 МПа, со средним значением 12 МПа. Кроме того, модуль Юнга оказался между 2,9 и 3,3 ГПа.

Твердость по Виккерсу спеченного аллотрансплантата варьировалась от 0,3 до 0,8 ГПа.

Такое высокое значение локальной твердости может быть связано с включением ZrO_2 , полученным в результате процесса измельчения. За исключением этого выброса, средняя твердость по Виккерсу составила приблизительно 0,6 ГПа.

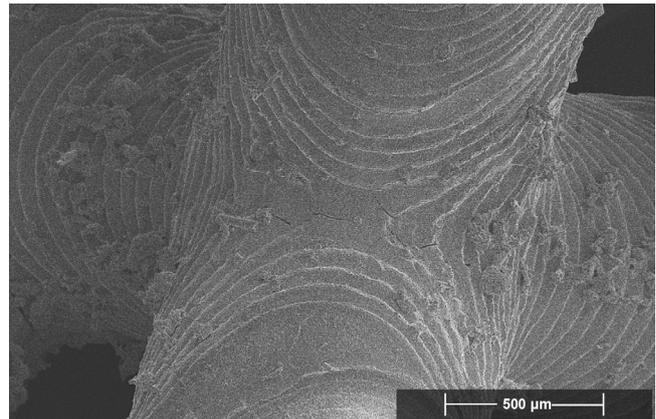


Рис. 4. Напечатанный на 3D-принтере и спеченный скаффолд, изготовленный из аллотрансплантата и имеющий сложную форму. Видны выпуклые и вогнутые участки объекта, слоистая структура; микротрещины в слоистой структуре объекта возникли во время термической обработки

Оценка эволюции фазы аллотрансплантата вследствие помола и аддитивных производственных процессов

Результаты анализа рентгеновской дифракции (XRD) для «образца А», «образца В» и «образца С» близко совпадают с контрольными пиками для карточки «[9-432] Hydroxyapatite» базы ICDD PDF-2. Все протестированные образцы прошли прокаливку при 900 °С перед анализом XRD, что отражает эффекты этой обработки. Небольшое количество аморфной фазы было обнаружено в «образце А» и «образце В», на что указывают более широкие пики и небольшие отклонения от базовой линии. Напротив, «образец С» показал более узкие и острые пики, что предполагает снижение содержания аморфной фазы. Кроме того, в «образце С» были идентифицированы новые пики, соответствующие CaO ($2\theta \approx 43^\circ$) и ZrO_2 ($2\theta \approx 34^\circ$). Наличие включений CaO можно объяснить механической активацией и потенциальной деградацией гидроксиапатита и аморфных соединений фосфата кальция. Пики ZrO_2 связаны с включениями диоксида циркония, которые загрязнили материал аллотрансплантата на втором этапе помола.

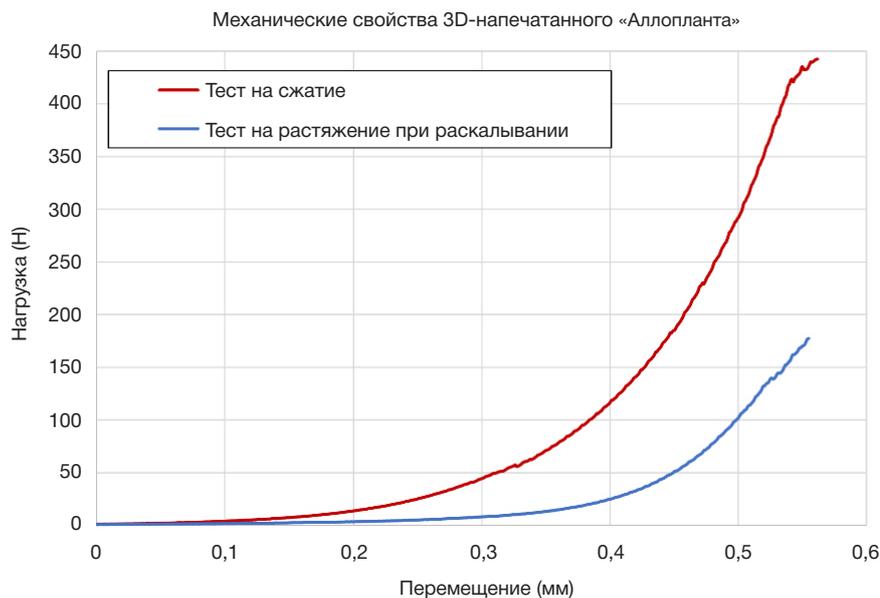


Рис. 5. Механическое поведение материала аллотрансплантата, напечатанного на 3D-принтере и спеченного при 1300 °С, при механическом испытании на сжатие (шесть образцов) и испытании на растяжение при раскалывании (шесть образцов)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Материал аллотрансплантата, полученный из кадаверных кортикальных костей человека, продемонстрировал потенциал для успешного применения в аддитивной процедуре на основе цифровой обработки света (DLP). В научной литературе мы не нашли исследований, посвященных применению костного аллогraftа для 3D-печати. Нами было показано, что материал на основе костного аллотрансплантата может эффективно использоваться с использованием методов аддитивного производства, демонстрируя поведение, аналогичное поведению синтетического гидроксиапатита в процессе 3D-печати.

Оптимизированные для синтетической кальций-фосфатной керамики протоколы печати и термообработки не обеспечили нужных свойств аллотрансплантата из кости. Признаком этого стали трещины в спеченных образцах, вызванные низкой плотностью коричневых тел и неоптимальным спеканием. Повысить плотность можно увеличением загрузки порошка в фотополимеризующейся суспензии. Оптимизация спекания потребует серии параметрических исследований и лабораторного анализа свойств материалов.

Несмотря на то что процесс изготовления образцов из аллотрансплантата, изготовленных аддитивным способом, не был оптимизирован, он позволил получить относительно высокую плотность спекания в микромасштабе, что указывает на потенциал для дальнейших улучшений. Примечательно, что не было пустот в углах сопряженных зерен, а естественные химические включения в структуре материала, такие как натрий (Na), магний (Mg), стронций (Sr), алюминий (Al) и калий (K), были сохранены в количествах, типичных для человеческих костей. Эти факторы свидетельствуют о превосходящих свойствах аллотрансплантата по сравнению с синтетическими альтернативами.

Операции помола способствовали эффективной гомогенизации химического состава аллотрансплантата. Однако из-за низкого коэффициента заполнения порошком в исходном сырье начальная плотность «коричневого тела» была недостаточной, что приводило к ненужным напряжениям и недостаточному уплотнению при термическом спекании. В результате образовывались межзерновые микротрещины и большие беззерновые пустоты, что способствовало пористости спеченного материала в 15,8%. Кристаллы кальций-фосфата в неповрежденной кости представляют собой пластинчатые частицы размером $40 \times 3 \times 7,5$ нм, переплетенные с коллагеновыми волокнами [12]. Отсутствие таких нанопластин в прокаленном образце указывает

на их спекание и превращение в округлые зерна при прокаливании.

Никаких существенных изменений в фазах материала или химического состава не наблюдалось на протяжении всего процесса производства. Коммерческий костный аллотрансплантат человека содержит приблизительно 60–70% минералов и 30–40% органических компонентов по массе [13–15]. Подробный анализ подтвердил кальций-дефицитную природу костного минерала со средним соотношением кальция к фосфору (Ca/P) 1,65. Керамика на основе фосфата кальция резорбируется быстрее при снижении соотношения Ca/P, поэтому ожидается, что биорезорбция для материалов аллотрансплантата будет протекать быстрее, чем для синтетического гидроксиапатита. Это соотношение соответствует ожиданиям для фазы гидроксиапатита с дефицитом кальция, подтвержденным результатами рентгеновской дифракции (XRD) [16]. В одних исследованиях показано, что соотношение Ca/P в человеческой кости в среднем составляет около 1,67 [17], по результатам других работ [18], костный минерал обычно имеет соотношение Ca/P ниже 1,67 из-за дефицита кальция.

Механические свойства спеченного материала имеют решающее значение для определения его общей прочности и твердости, особенно с учетом неоптимизированной микроструктуры материала. Следовательно, улучшения свойств материала могут быть достигнуты путем оптимизации технологий обработки и производства.

ВЫВОДЫ

Материал аллотрансплантата, используемый в этом исследовании, был получен из кадаверной кортикальной костной ткани человека. Этот материал подвергся обжигу и впоследствии был измельчен в порошок микронного размера для создания фотополимеризуемой суспензии и для последующего его использования в процессе аддитивного производства на основе DLP. Результаты подтвердили высокую совместимость материала аллотрансплантата с технологиями аддитивного производства. Полимеризационные испытания и операции 3D-печати продемонстрировали стабильность материала на основе костного аллотрансплантата на каждом этапе процесса аддитивного производства. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения характеристик аддитивно изготовленных аллотрансплантатных имплантов и сравнения их с синтетическими аналогами. Это включает оптимизацию этапов подготовки процесса аддитивного производства и оценку их потенциала для регулирования процессов остеоиндукции, остеокондукции и механической стабильности как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*.

Литература

1. GlobalData Plc, United States (US) Orthopedic Procedures Count By Segments And Forecast To 2030, GlobalData Plc, John Carpenter House, John Carpenter Street, London, EC4Y 0AN, UK, 2023. Available from: <https://www.globaldata.com/store/report/usa-orthopedic-procedures-analysis/#:~:text=US%20Orthopedic%20Market%20Report%20Overview,US%20was%2018%2C577%2C953%20in%202022>.
2. Rogers GF, Greene AK, Autogenous bone graft: basic science and clinical implications, *J Craniofac Surg.* 2012; 23: 323–7. Available from: <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318241dcba>
3. Dutta SR, Passi D, Singh P, Bhuibhar A, Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Ir J Med Sci.* 1971; 184 (2015): 101–06. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11845-014-1199-8>.
4. Yang C, Zhuo W, Li Q, Huang C, Yan H, Jin D, Preliminary outcomes of allograft and hydroxyapatite as substitutes for autograft in anterior cervical discectomy and fusion with self-locking standalone cages. *J Orthop Surg.* 2021; 16: 123. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02257-0>.
5. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T, Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLOS ONE.* 2019; 14: e0218404. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218404>.

6. Buj-Corral I, Tejo-Otero A. 3D Printing of Bioinert Oxide Ceramics for Medical Applications. *J Funct Biomater*. 2022; 13 (3): 155. DOI: 10.3390/jfb13030155. PMID: 36135590; PMCID: PMC9505679. Available from: <https://doi.org/10.3390/jfb13030155>.
7. Thakur N, Carretta M, Komissarenko D, Blugan G. Advancements in DLP 3D printing: High strength alumina toughened zirconia ceramics for biomedical applications. *Open Ceramics*. 2024; 18: 100601. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2024.100601>.
8. Sadaf Bashir Khan, Syed Irfan, Zhengjun Zhang, Weifeng Yuan. *ACS Applied Bio Materials*. 2025; 8 (8): 6470–525. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsbm.4c01923>.
9. Muldashev ER, Muslimov SA, Vyalkov VA, Galimova VU, Nigmatullin RT, Salikhov AY, et al. Biomaterial alloplant dlja regenerativnoj hirurgii, RU2189257C1. 2002.
10. American Society for Testing and Materials, ASTM C1424 -Standard Test Method for Monolithic Compressive Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature. 2004.
11. International Organization for Standardization, ISO 10993-14:2001(E): Biological evaluation of medical devices — Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics. 2001.
12. Jacobs PF. *Fundamentals of Stereolithography*. 1992.
13. Dey P. Bone Mineralisation. In: Churchill DG, Dutour Sikirić M, Čolović B, Füredi H. Milhofer, editors. *Contemp Top Phosphorus Biol Mater*. IntechOpen. 2020. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.92065>.
14. Pietrzak WS, Woodell-May J, The Composition of Human Cortical Allograft Bone Derived from FDA/AATB-Screened Donors. *J Craniofac Surg*. 2005; 16: 579–85. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.SCS.0000159086.44801.C7>.
15. Wang W, Yeung KWK, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 2017; 2: 224–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
16. Kuhn LT, Grynblas MD, Rey CC, Wu Y, Ackerman JL, Glimcher MJ. A Comparison of the Physical and Chemical Differences Between Cancellous and Cortical Bovine Bone Mineral at Two Ages. *Calcif Tissue Int*. 2008; 83: 146–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00223-008-9164-z>.
17. Ishikawa K, Ducheyne P, Radin S, Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis. *J Mater Sci Mater Med*. 1993; 4: 165–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00120386>.
18. Gotoh Y, Hiraiwa K, Nagayama M. In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone Miner*. 1990; 8: 239–50. Available from: [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(90\)90109-s](https://doi.org/10.1016/0169-6009(90)90109-s).

References

1. GlobalData Plc, United States (US) Orthopedic Procedures Count By Segments And Forecast To 2030, GlobalData Plc, John Carpenter House, John Carpenter Street, London, EC4Y 0AN, UK, 2023. Available from: <https://www.globaldata.com/store/report/usa-orthopedic-procedures-analysis/#:~:text=US%20Orthopedic%20Market%20Report%20Overview,US%20was%2018%2C577%2C953%20in%202022>.
2. Rogers GF, Greene AK, Autogenous bone graft: basic science and clinical implications, *J Craniofac Surg*. 2012; 23: 323–7. Available from: <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318241dcba>.
3. Dutta SR, Passi D, Singh P, Bhuibhar A, Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Ir J Med Sci*. 1971; 184 (2015): 101–06. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11845-014-1199-8>.
4. Yang C, Zhuo W, Li Q, Huang C, Yan H, Jin D, Preliminary outcomes of allograft and hydroxyapatite as substitutes for autograft in anterior cervical discectomy and fusion with self-locking standalone cages. *J Orthop Surg*. 2021; 16: 123. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02257-0>.
5. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T, Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality. *PLOS ONE*. 2019; 14: e0218404. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218404>.
6. Buj-Corral I, Tejo-Otero A. 3D Printing of Bioinert Oxide Ceramics for Medical Applications. *J Funct Biomater*. 2022; 13 (3): 155. DOI: 10.3390/jfb13030155. PMID: 36135590; PMCID: PMC9505679. Available from: <https://doi.org/10.3390/jfb13030155>.
7. Thakur N, Carretta M, Komissarenko D, Blugan G. Advancements in DLP 3D printing: High strength alumina toughened zirconia ceramics for biomedical applications. *Open Ceramics*. 2024; 18: 100601. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2024.100601>.
8. Sadaf Bashir Khan, Syed Irfan, Zhengjun Zhang, Weifeng Yuan. *ACS Applied Bio Materials*. 2025; 8 (8): 6470–525. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsbm.4c01923>.
9. Muldashev ER, Muslimov SA, Vyalkov VA, Galimova VU, Nigmatullin RT, Salikhov AY, et al. Biomaterial alloplant dlja regenerativnoj hirurgii, RU2189257C1. 2002.
10. American Society for Testing and Materials, ASTM C1424 -Standard Test Method for Monolithic Compressive Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature. 2004.
11. International Organization for Standardization, ISO 10993-14:2001(E): Biological evaluation of medical devices — Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics. 2001.
12. Jacobs PF. *Fundamentals of Stereolithography*. 1992.
13. Dey P. Bone Mineralisation. In: Churchill DG, Dutour Sikirić M, Čolović B, Füredi H. Milhofer, editors. *Contemp Top Phosphorus Biol Mater*. IntechOpen. 2020. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.92065>.
14. Pietrzak WS, Woodell-May J, The Composition of Human Cortical Allograft Bone Derived from FDA/AATB-Screened Donors. *J Craniofac Surg*. 2005; 16: 579–85. Available from: <https://doi.org/10.1097/01.SCS.0000159086.44801.C7>.
15. Wang W, Yeung KWK, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 2017; 2: 224–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
16. Kuhn LT, Grynblas MD, Rey CC, Wu Y, Ackerman JL, Glimcher MJ. A Comparison of the Physical and Chemical Differences Between Cancellous and Cortical Bovine Bone Mineral at Two Ages. *Calcif Tissue Int*. 2008; 83: 146–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00223-008-9164-z>.
17. Ishikawa K, Ducheyne P, Radin S, Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis. *J Mater Sci Mater Med*. 1993; 4: 165–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00120386>.
18. Gotoh Y, Hiraiwa K, Nagayama M. In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Bone Miner*. 1990; 8: 239–50. Available from: [https://doi.org/10.1016/0169-6009\(90\)90109-s](https://doi.org/10.1016/0169-6009(90)90109-s).

ЭКСПРЕССИЯ микроРНК miR146A В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ И АРТРОЗОМ КОЛЕННОГО СУСТАВА НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА

А. С. Иванов^{1,2} ✉, Т. П. Тананакина¹, С. А. Кащенко¹, И. А. Погорелова¹

¹ ФГБОУ ВО ЛГМУ имени Святителя Луки, Россия

² Негосударственное частное учреждение Научно-диагностический центр «Поликлиника на Смоленской»

МикроРНК не поддаются действию РНКаз и высокоспецифичны для различных патологических состояний, в частности воспаления, что позволило рассматривать их как биомаркеры данного патологического процесса. Обнаружить их удалось во всех жидкостях организма, в патогенезе воспаления ключевую роль играют микроРНК miR146a. Целью работы было определить уровень экспрессии miR146a у крыс с гонартрозом, сочетанным ожирением и коррекцией дексаметазоном с целью разработки дальнейших патогенетических механизмов лечения остеоартроза. Для исследования отобраны 180 самцов белых крыс линии Вистар в возрасте 8–10 недель массой 200–250 г. Животные были разделены на пять групп по 36 в каждой: в первой группе вводили физиологический раствор хлорида натрия внутримышечно, остальным экспериментально смоделировано ожирение и артроз коленного сустава. Особям второй группы вводили 1,0 мл раствора хлорида натрия внутримышечно, третьей, четвертой и пятой — дексаметазон в дозе 1 нг/мл, 10 нг/мл и 100 нг/мл соответственно. Забор крови для проведения исследования проводили на 3, 5, 10 сутки. Полученные показатели исследовали при уровне статистической значимости ($p < 0,05$). Установлено повышение уровня miR146a у животных второй группы в сравнении с остальными, за счет развития воспаления на фоне ожирения и сопутствующего гонартроза. В третьей группе уровень экспрессии незначительно снижился, но оставался высоким. В четвертой группе на фоне применения 10 нг/мл дексаметазона уровень экспрессии miR-146a снижился максимально на 3 и 5 сутки. В пятой группе изменения практически отсутствовали, показатель снижился незначительно. Наибольшую эффективность в процессе эксперимента выявлена при дозе дексаметазона 10 нг/мл — она обладала наибольшей противовоспалительной активностью по отношению к остальным.

Ключевые слова: гонартроз, дексаметазон, микроРНК, воспаление, ожирение, экспрессия, miR146a

Вклад авторов: А. С. Иванов — дизайн исследования, проведение экспериментальной части работы; Т. П. Тананакина — дизайн исследования, проведение экспериментальной части, научное сопровождение; С. А. Кащенко — редактирование, научное сопровождение, участие в подготовке эксперимента; И. А. Погорелова — техническое редактирование, участие в подготовке эксперимента.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено на заседании этического комитета ФГБОУ ВО «ЛГМУ им. Свт. Луки» МЗ РФ (протокол № 1 от 23 сентября 2025 г.), проведено в соответствии с нормами приказа Минздрава России № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики», принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных экспериментах.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Сергеевич Иванов
ул. А. Дикого, д. 16А, кв. 73, 111396, г. Москва, Россия; sashatratmatolog1985@mail.ru

Статья получена: 04.10.2025 **Статья принята к печати:** 30.10.2025 **Опубликована онлайн:** 11.11.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.056

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/>).

EXPRESSION OF microRNA MIR146A IN THE BLOOD PLASMA OF RATS WITH OBESITY AND KNEE ARTHROSIS AFTER ADMINISTRATION OF DEXAMETHASONE

Ivanov AS^{1,2} ✉, Tananakina TP¹, Kashchenko SA¹, Pogorelova IA¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "LSMU named St. Luke", Russia

² Non-governmental private institution Scientific Diagnostic Center "Polyclinic on Smolenskaya"

MicroRNAs are resistant to RNases and are highly specific for various pathological conditions, particularly inflammation, allowing them to be considered inflammation biomarkers. They were detected in all body fluids, and miR146a plays a key role in the pathogenesis of inflammation. A total of 180 male white Wistar rats were selected for the study. All animals were 8–10 weeks old and weighed 200–250 grams. The animals were divided into five groups of 36 each. The first received saline solution intramuscularly, while the others underwent experimental modeling of obesity and knee arthrosis. The second group received 1.0 ml of saline solution intramuscularly, while the third, fourth, and fifth groups received dexamethasone at doses of 1 ng/ml, 10 ng/ml, and 100 ng/ml, respectively. Blood samples for the study were collected on days 3, 5, and 10. The obtained parameters were analyzed at the statistical significance level ($p < 0.05$). Increased miR146a levels were observed in animals in the second group compared to the others, due to the development of inflammation associated with obesity and concomitant gonarthrosis. In the third group, expression levels decreased slightly, remaining high. In the fourth group, with the use of 10 ng/ml dexamethasone, miR146a expression levels decreased most significantly on days 3 and 5. In the fifth group, virtually no changes were observed, with the parameter decreasing only slightly. The 10 ng/ml dexamethasone dose demonstrated the greatest efficacy during the experiment, possessing the greatest anti-inflammatory activity compared to the other doses.

Keywords: gonarthrosis, dexamethasone, microRNA, inflammation, rats, obesity, expression, miR146a

Author contribution: Ivanov AS — study design development, experimental design; Tananakina TP — study design development, participation in the experimental design, and scientific supervision; Kashchenko SA — scientific editing, scientific supervision, and participation in the experimental design; Pogorelova IA — technical proofreading, participation in the experimental design.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the St. Luke's Lugansk State Medical University of the Russian Ministry of Health (protocol No 1 dated 23 September 2025). When working with laboratory animals, the conditions of care and experimentation were fully compliant with the standards of Order No. 199n of the Russian Ministry of Health "On Approval of the Rules of Good Laboratory Practice" 1, adhering to the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, and strictly adhering to the Directive of the European Parliament and of the Council of the European Union on the Protection of Animals used for Scientific Purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksey S. Ivanov
A. Dikogo, 16A, kv. 73, 111396, Moskva, Rossiya; sashatratmatolog1985@mail.ru

Received: 04.10.2025 **Accepted:** 30.10.2025 **Published online:** 11.11.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.056

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 2008 г. в плазме крови было экспериментально обнаружено присутствие некоторых форм микро-РНК в стабильной форме, исключающей воздействие РНКаз, что послужило началом их исследования в качестве биомаркеров воспалительного процесса [1–5]. Стабильность обусловлена дисрегуляцией клеточной экспрессии микроРНК, что можно наблюдать при инфекции, кроме того, клетка способна высвобождать некоторые формы во внеклеточное пространство. Дальнейшие исследования показали наличие биомаркеров не только в плазме крови, но и в слюне, моче, желчи, грудном молоке и других жидкостях организма [6]. На сегодняшний день имеются данные о специфических изменениях профиля экспрессии микроРНК при различных патологических состояниях, например, при онкологии, заболеваниях сердца и сосудов, воспалении, старении организма и др. [7–8].

Прогресс, наступивший в изучении взаимосвязи различных генов, их продуктов и факторов окружающей среды, привел к очевидности роли эпигенетической изменчивости, состоящей в изменении экспрессии генов, которые не влияют на структуру ДНК, но способны передаваться в ряду поколений. Есть три уровня эпигенетической регуляции — геномный (метилирование ДНК), протеомный (отвечает за модификацию гистонов), а также транскриптомный (регуляция РНК). МикроРНК представляют собой большой класс малых некодирующих информацию РНК-молекул длиной 18–25 нуклеотидов, регулирующих экспрессию генов за счет комплементарного взаимодействия с 3'-нетранслируемыми участками мРНК, что приводит к разрушению молекулы РНК или угнетению процессов трансляции [9].

Известно большое количество микроРНК, которые специфичны для каждого патологического состояния и дают возможность начать наиболее раннюю диагностику с целью начала своевременного лечения. По последним данным, в патогенезе воспалительных заболеваний задействованы микроРНК miR21 и miR146a [10]. Выявлена роль miR146a в регуляции клеточного цикла, процессов апоптоза, пролиферации и дифференцировке клеток, роль в патогенезе инфекционных заболеваний [11–13].

За последние 10 лет выявлена роль микроРНК в качестве специфических факторов остеоартроза и ревматических заболеваний [14–18]. Обнаружение miR146a в синовиальной жидкости и плазме при остеоартрите является потенциальным диагностическим и прогностическим маркером [18]. Повышение уровня miR146a в плазме крови свидетельствует о развитии и прогрессировании гонартроза, который в подавляющем большинстве случаев сочетается с наличием избыточной массы тела [20]. MiR146a считают маркером ожирения, и повышение его уровня в плазме крови является признаком его развития и прогрессирования. Физическая активность способствует снижению массы тела, в результате чего снижается уровень экспрессии miR146a [21].

Использование при лечении гонартроза нестероидных и стероидных противовоспалительных средств (например, целекоксиба, ибупрофена, дексаметазона, метотрексата и др.) способствует подавлению синтеза провоспалительных цитокинов и miR-146a за счет усиления экспрессии miR149-5p и miR-let-7c-5p [22, 23]. Среди глюкокортикостероидов для лечения воспалительных заболеваний суставов, в том числе и остеоартроза, одним из наиболее часто применяемых препаратов является дексаметазон [24]. По данным метаанализа за 2018 г., уровень экспрессии

miR146a выше у пациентов с ревматоидными артритом и остеоартрозом, чем у здоровой группы пациентов, поскольку он служит регулятором первичного иммунного ответа и участвует в патогенезе остеоартроза [22]. Остается недостаточно изученным уровень экспрессии miR146a на фоне ожирения, сочетанного с артрозом, на фоне коррекции глюкокортикостероидами.

Исследование уровня экспрессии miR146a у крыс на фоне ожирения и остеоартроза дает возможность понять патогенетические механизмы развития заболевания и разработать оптимальные схемы лечения. Целью данного исследования было разработать патогенетическую схему лечения остеоартроза, сочетанного с ожирением на фоне применения дексаметазона с учетом уровня экспрессии miR146a, дать оценку влияния различных доз дексаметазона (1 нг/мл, 10 нг/мл и 100 нг/мл) на уровень экспрессии miR-146a у крыс с экспериментальной моделью ожирения и гонартроза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент был проведен на базе Научно-исследовательского центра «Аск-Хэлс» (Болгария) и ФГБОУ ВО «ЛГМУ им. Свт. Луки» МЗ РФ. Для проведения эксперимента было отобрано 180 белых лабораторных крыс-самцов линии Вистар, возрастом 8–10 недель, массой 200–250 г. Животных содержали в условиях вивария при температуре 22 ± 2 °C и 12-часовом цикле дня и ночи при свободном доступе к воде и пище. Путем случайного отбора животные были разделены на пять групп ($n = 36$). Особям первой (контрольной) группы вводили внутримышечно 1,0 мл физиологического раствора хлорида натрия, второй (ожирение + гонартроз) — 1,0 мл физиологического раствора хлорида натрия, третьей, четвертой и пятой (ожирение + гонартроз) — 1,0 нг/мл, 10 нг/мл и 100 нг/мл внутримышечно раствора дексаметазона соответственно.

Дозы дексаметазона подбирали из такого расчета: 1 нг/мл — низкая, отражает минимально эффективную концентрацию с целью моделирования минимального противовоспалительного эффекта без выраженной иммуносупрессии; 10 нг/мл — терапевтическая доза, которую применяют с целью подавления цитокин-индуцированного воспаления у крыс; 100 нг/мл — высокая доза, использована с целью моделирования возможного «парадоксального» эффекта при гиперэкспозиции глюкокортикоидов. Диапазон доз подбирали с целью оценки дозозависимых ответов miR146a от минимальной до супертерапевтической. Физиологический раствор и дексаметазон вводили внутримышечно 1 раз в сутки ежедневно на протяжении 10 дней. На 3, 5 и 10 сутки проводили забор крови из хвостовой вены с последующим центрифугированием с целью получения сыворотки для определения динамики экспрессии miR146a. Такая схема полностью соответствует ранее опубликованным работам по моделированию противовоспалительного эффекта дексаметазона у лабораторных крыс [24]. Побочные эффекты дексаметазона оценивали на основе поведенческой активности (тест «открытое поле»), массы тела, и индекса Ли, состояния шерсти и кожных покровов, уровня глюкозы крови (выраженных дозозависимых побочных эффектов при введении 1 и 10 нг/мл не наблюдалось, при 100 нг/мл наблюдали признаки гипергликемии и снижение активности, что согласуется с известными побочными эффектами высоких доз глюкокортикоидов).

Ожирение на животных моделировали с помощью высококалорийной диеты путем добавления в рацион повышенного количества жиров (45%) растительного и животного происхождения и углеводов (35%) на протяжении 8 недель. Для оценки результата использовали индекс Ли (Ли = $1000 \times (\text{масса тела (г)} / (\text{длина от кончика носа до ануса (см)}))$). О наличии ожирения свидетельствовал показатель более 310 и повышение массы тела на 25–40% по сравнению с исходной величиной, что свидетельствует о средней степени ожирения [25]. Гонартроз был смоделирован по авторской методике путем многократного повреждения суставного хряща малоинвазивным методом с последующей иммобилизацией на протяжении 2–4 недель с использованием авторского устройства до достижения достоверных рентгенологических признаков артроза при помощи высокочастотного портативного стоматологического рентген-аппарата Posdion Rextar X, 70 кВ (Posdion, Южная Корея).

Определение микроРНК (miR146a) проводили методом количественной обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в режиме реального времени. Сыворотку получили путем центрифугирования 1,0 мл венозной крови крыс, отобранной из хвостовой вены, при 12 000 об./мин, на протяжении 15 мин при температуре 4 °С. Полученные образцы были подвергнуты немедленному замораживанию при температуре –80 °С до момента исследования.

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Германия; № 217184) в соответствии с протоколом производителя. Контроль эффективности экстракции проводили путем добавления внешнего синтетического контроллера (cel-miR-39, Qiagen, Германия), РНК очищали на силикагелевых колонках и путем элюирования в объеме 14 мкл без-RNase воды. Для синтеза кДНК использовали реагенты TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, США; № 4366596) совместно со специфическими штаммами праймеров TaqMan™ MicroRNA Assays (США) для miR146a (№ 000468).

Выполнение количественной ПЦР проводили на 96-луночных планшетах на амплификаторе QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с использованием реагентов TaqMan™ Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, США, № 4324018). В качестве референсной РНК использовали U6 snRNA, уровень экспрессии которой оставался стабильным во всех исследуемых группах.

Для выполнения каждой реакции использовали три технических повторности, для оценки относительной экспрессии микроРНК применяли метод Ливака ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$).

Статистическая обработка результатов

После получения цифрового материала рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение, статистически

анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в пакете программ SPSS (v.16.0 для Windows, 2007; SPSS, Inc., Чикаго, Иллинойс). Значимые различия обозначены как $p < 0,05$, при подсчете процентного соотношения данные первой группы принимали за 100%. Для проверки одномерности распределения результатов использовали диаграммы по типу «ящик с усами» [26]. Статистическую обработку и построение диаграмм и графиков проводили с помощью программы Statistica10.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенного исследования установлена зависимость экспрессии микроРНК miR146a на фоне ожирения, гонартроза и применения дексаметазона. В организме miR146a принимает участие в регуляции иммунного ответа и воспалительного процесса путем подавления последнего. MiR146a приводит к снижению продукции провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и TNF α), принимает активное участие в регуляции дифференцировки Т-клеток, в нейровоспалительных процессах.

Исследованием установлено возрастание miR146a в группе 2, что дает право предполагать развитие воспаления в организме, которое вызывают цитокины, продуцируемые адипоцитами, и дополнительно провоцируемое гонартрозом. Использование в эксперименте дексаметазона приводит к снижению показателей miR146a в плазме крови во всех исследуемых группах на фоне его длительного применения в качестве противовоспалительного средства с целью лечения гонартроза, сочетанного с избыточной массой тела (табл. 1).

По результатам исследования установлено повышение показателя miR146a на третьи сутки в группе 2 на 188,6% ($p < 0,05$), на пятые сутки — на 184,5% ($p < 0,05$), на 10 сутки — на 146,6% ($p < 0,05$), в сравнении с группой 1, что может отражать развитие ответной реакции организма на воспаление, к которому приводит ожирение, сочетанное с гонартрозом. В группе 3 наблюдали снижение показателя miR146a в сравнении с группой 2, однако показатель оставался высоким. На третьи сутки miR146a выросла на 151,1% ($p < 0,05$), на пятые — на 156,7% ($p < 0,05$), спустя 10 суток эксперимента наблюдали повышение на 146,6% ($p < 0,05$) в сравнении с группой 1. При сравнении показателей групп 1 и 3 установлено повышение уровня miR146a на 151,5% ($p < 0,05$) на третьи сутки, на 156,7% ($p < 0,05$) — на пятые сутки, на 146,6% ($p < 0,05$) — 10 сутки.

При динамическом анализе экспрессии miR146a в группе 1 на пятые сутки увеличения не произошло, на 10 сутки уровень повысился на 106,1% ($p < 0,05$). В группе 2 на пятые сутки наблюдалось снижение miR146a на 2,2% ($p < 0,05$), на 10 сутки — на 3,3% ($p < 0,05$) в сравнении с третьими сутками и на 1,2% ($p < 0,05$) при сравнении с пятыми сутками эксперимента. В группе 3 на пятые сутки в сравнении с третьими сутками произошло повышение на

Таблица 1. Динамика показателей экспрессии miR146a сыворотки крыс в группах 1, 2 и 3 на 3, 5, 10 сутки

Показатель	miR146a			p		
	3	5	10	3	5	10
Группа 1, n = 36	0,97	0,97	1,03	0,07	0,03	0,07
Группа 2, n = 36	1,83	1,79	1,77	0,08	0,08	0,02
Группа 3, n = 36	1,47	1,52	1,51	0,05	0,05	0,05

Примечания: p — средняя квадратическая ошибка на уровне значений 0,05.

Таблица 2. Динамика показателей экспрессии miR146a сыворотки крыс в группах 1, 2 и 4 на 3, 5, 10 сутки

Показатель	miR146a			p		
	3	5	10	3	5	10
Сутки						
Группа 1, n = 36	0,97	0,97	1,03	0,07	0,03	0,07
Группа 2, n = 36	1,83	1,79	1,77	0,08	0,08	0,02
Группа 4, n = 36	1,09	1,05	1,17	0,04	0,07	0,04

Примечания: p — средняя квадратическая ошибка на уровне значений 0,05.

103,4% ($p < 0,05$), на 10 сутки — на 102,7% ($p < 0,05$) в сравнении с третьими сутками и снижение на 0,7% ($p < 0,05$) в сравнении с пятыми сутками.

Введение в организм 10 нг/мл дексаметазона оказало более выраженный противовоспалительный эффект в группе 3 по сравнению с остальными. Показатель микроРНК miR146a был достоверно выше в сравнении с группой 1, но наблюдали его снижение по отношению к группе 2 (табл. 2).

Экспериментально установили повышение уровня экспрессии miR146a на третьи сутки эксперимента на 112,3% ($p < 0,05$), на пятые сутки — на 108,2% ($p < 0,05$), а на 10 сутки — на 113,5% ($p < 0,05$) в сравнении с группой 1, что было статистически меньше, чем в группе 2. При сравнении уровня экспрессии miR146a в группе 4 с показателями группы 2 установлено снижение на 40,5% ($p < 0,05$) на третьи сутки, на 41,4% ($p < 0,05$) — на пятые сутки, на 39,9% ($p < 0,05$) — на 10 сутки.

Динамический анализ показателя в пределах группы 4 дает понять четкую тенденцию к снижению уровня экспрессии miR146a на пятые сутки на 3,7% ($p < 0,05$) в сравнении с третьими сутками, на 10 сутки уровень вырос на 107,3% ($p < 0,05$) в сравнении с третьими сутками и на 111,4% ($p < 0,05$) в сравнении с пятыми сутками.

Иной результат наблюдали при повышении дозы дексаметазона до 100 нг/мл. Показатель микроРНК miR146a был достоверно выше, чем в группе 1. В сравнении с группой 2 показатели незначительно отличались, но были достоверно ниже (табл. 3).

Наблюдали достоверное повышение показателя miR146a в группе 5 на третьи сутки на 176,2% ($p < 0,05$) в сравнении с группой 1. При исследовании микроРНК в плазме крови животных из группы 5 на пятые сутки показатель увеличился на 178,3% ($p < 0,05$) по отношению к группе 1. На 10 сутки эксперимента наблюдали достоверное повышение концентрации miR146a в группе 5 на 159,2% ($p < 0,05$) в сравнении с группой 1. При сопоставлении показателей в группе 5 с группой 3 установили снижение концентрации на фоне введения дексаметазона, на третьи сутки на 6,6% ($p < 0,05$), на пятые сутки — на 3,4% ($p < 0,05$), на 10 сутки — на 5,7% ($p < 0,05$).

Динамика показателя внутри группы 5 продемонстрировала изменение уровня экспрессии miR146a на фоне введения дексаметазона, на пятые сутки показатель вырос на 101,1% ($p < 0,05$) в сравнении с третьими сутками, на 10 сутки он снизился на 2,4% ($p < 0,05$) в сравнении с

третьими сутками и на 3,5% ($p < 0,05$) в сравнении с пятыми сутками.

Динамика изменения miR146a в плазме крови во всех исследуемых группах представлена на рисунке.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования установлено повышение концентрации микроРНК miR146a в плазме крови крыс во всех группах под действием дексаметазона в сравнении с группой контроля. У животных группы 2 показатель был максимален, что свидетельствует в пользу воспалительного процесса, вызываемого группой цитокинов, выделяемых адипоцитами, и одновременным развитием, а также последующим прогрессирующим гонартрозом [27]. Это обстоятельство подтверждается повышением экспрессии miR146a у животных группы 3. На фоне введения дексаметазона в дозе 1 нг/мл наблюдалось снижение уровня экспрессии miR146a у животных группы 3 в сравнении с группой 2, что указывает на противовоспалительные свойства дексаметазона даже в минимальной дозе. Уровень экспрессии miR146a в группе 3 оставался высоким по отношению к группе 1, что дает возможность предполагать низкую эффективность 1 нг/мл дексаметазона в отношении анализируемого показателя на протяжении всего периода исследования в сравнении с дозой в 10 нг/мл [28].

В группе 4 на фоне введения дексаметазона наблюдали более выраженное снижение уровня экспрессии miR146a, что можно также объяснить ингибированием цитокинов, угнетением воспаления, которое вызывает ожирение и избыточную массу тела [24]. Максимальный результат в этой группе наблюдался на пятые сутки эксперимента, что может свидетельствовать о накопительном эффекте препарата за счет его ежедневного использования или о блокировке рецепторов клеток, чувствительных к цитокинам [29]. На 10 сутки при сохранении противовоспалительного эффекта уровень экспрессии miR146a незначительно повышается, что может быть связано со снижением восприимчивости рецепторов к препарату или повышенным его метаболизмом.

В группе 5 на фоне применения дексаметазона не наблюдали значительного изменения показателей miR146a в сравнении с группой 2, что говорит в пользу низкой эффективности дозы 100 нг/мл дексаметазона на протяжении всего периода эксперимента. Подобное может свидетельствовать о гибели рецепторов к

Таблица 3. Динамика показателей экспрессии miR146a сыворотки крыс в группах 1, 2 и 5 на 3, 5, 10 сутки

Показатель	miR146a			p		
	3	5	10	3	5	10
Сутки						
Группа 1, n = 36	0,97	0,97	1,03	0,07	0,03	0,07
Группа 2, n = 36	1,83	1,79	1,77	0,08	0,08	0,02
Группа 5, n = 36	1,71	1,73	1,67	0,03	0,04	0,03

Примечания: p — средняя квадратическая ошибка на уровне значений 0,05.

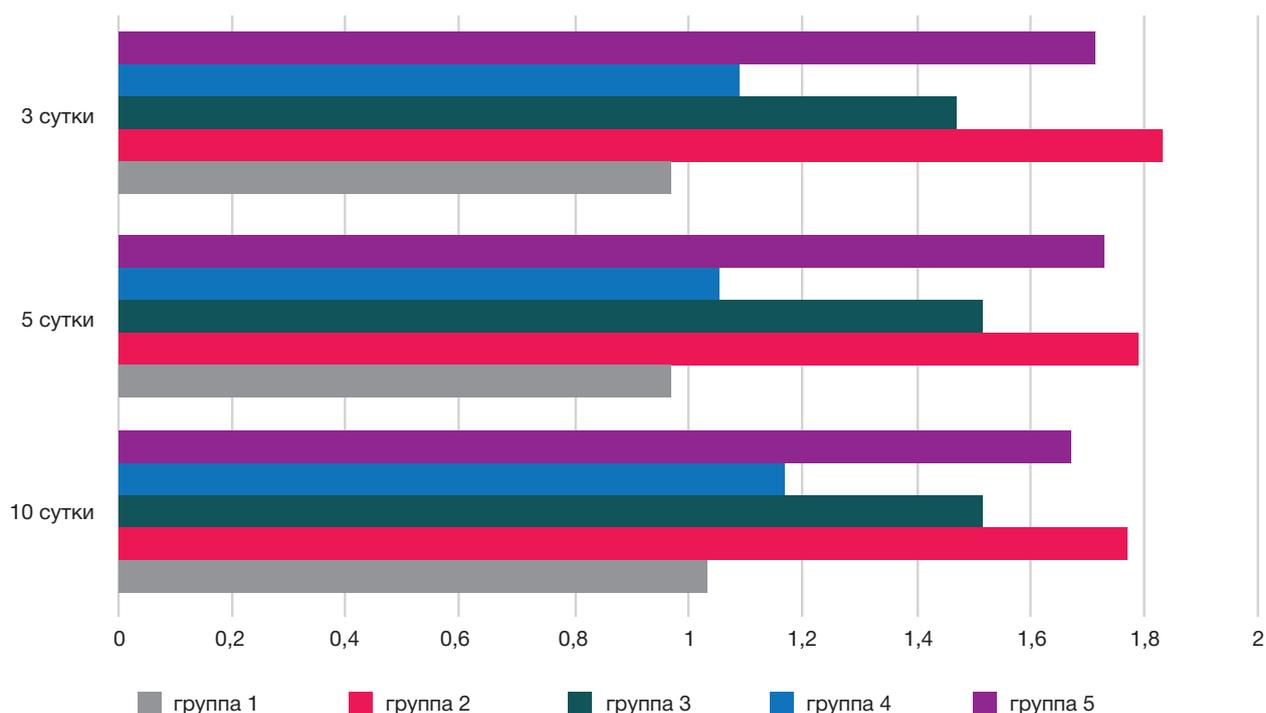


Рис. Динамика изменения показателя miR146a плазмы крови крыс в группах 1–5 на 3, 5, 10 сутки

дексаметазону за счет его высокой концентрации или невосприимчивости к нему в высокой дозе, несмотря на противовоспалительные свойства препарата [30].

Выводы

В процессе исследования установлено, что максимальный положительный эффект был достигнут в группе 4, о чем говорит стойкое и наиболее значимое снижение уровня экспрессии miR146a. Данное обстоятельство дает возможность рекомендовать дозу 10 нг/мл в качестве патогенетически обоснованного лечения гонартроза, сочетанного с ожирением на протяжении длительного периода времени. Незначительный положительный эффект от введения дексаметазона наблюдался в группе 3, поскольку дексаметазон приводил к снижению уровня экспрессии miR146a, однако показатель оставался высоким по отношению к группе 1. Дексаметазон в дозе 1 нг/мл может быть рекомендован в качестве патогенетической терапии болевого синдрома или при

наличии минимального воспалительного процесса, а также при лечении гонартроза, не сочетанного с ожирением. Установлено, что доза 100 нг/мл дексаметазона не проявляет эффективность на протяжении всего периода введения и не приводит к выраженному снижению уровня экспрессии miR146a в группе 5: уровень оставался высоким, колебания показателя были незначительны на протяжении всего периода эксперимента. В связи с этим нельзя говорить о дозозависимом эффекте дексаметазона 100 мг на показатель miR146a, что требует дальнейшего клинического изучения. Перспектива дальнейших исследований состоит в изучении эффекта от применения других разновидностей микроРНК плазмы крови на фоне гонартроза, сочетанного с ожирением, а также уровня глюкозы крови на фоне применения дексаметазона, функции рецепторов клеток к дексаметазону и концентрации провоспалительных цитокинов, состояния коры надпочечников. Вызывают интерес дальнейшее изучение и подбор дозы дексаметазона в зависимости от уровня экспрессии miR146a в клинической практике.

Литература

- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105 (30): 10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
- Ширшова А. Н., Шамовская Д. А., Боярских У. А., Апалько С. В., Лесков Л. С., Соколов А. В., и др. Оценка значимости определения количества miR-146a в плазме крови человека для диагностики колоректального рака. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2017; 4: 31–36.
- Гареев И. Ф., Бейлерли О. А. Циркулирующие микроРНК как биомаркеры: какие перспективы? *Профилактическая медицина*. 2018; 21 (6): 142–50. DOI: 10.17116/profmed201821061142.
- Васильев С. В., Аксельрод А. С., Желанкин А. В., Щечкохин Д. Ю., Генерозов Э. В., Шарова Е. И., и др. Циркулирующие микроРНК-21-5р, микроРНК146а-5р, микроРНК320а3р у пациентов с фибрилляцией предсердий в сочетании с гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022; 21(1): 2814. DOI: 10.15829/1728-8800-2022-2814.
- Li Y, Tan W, Ye F, et al. Identification of microRNAs and genes as biomarkers of atrial fibrillation using a bioinformatics approach. *J Intern Med Res*. 2019; 47 (8): 3580–9. DOI:10.1177/0300060519852235.
- Duan X, Wang L, Sun G, Yan W, Yang Y. Understanding the cross-talk between host and virus in poultry from the perspectives of microRNA. *Poult Sci*. 2020; 99 (4): 1838–46. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.053.
- Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. MicroRNAs in action: Biogenesis, function and regulation. *Na. Rev Genet*. 2023; 24: 816–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>.
- Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in disease: From mechanisms to therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2024; 25:

- 211–32. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00662-1>.
9. Дьяченко Н. А., Улитина А. С., Лукина О. В., Пчелина С. Н., Трофимов В. И., Миронова Ж. А. Экспрессия микроРНК miR-21 и miR-146a у пациентов мужского пола с перекрестным фенотипом бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. Пульмонология. 2020; 30 (3): 263–69. DOI: 10.18093/0869-0189-2020-30-3-263-269.
 10. Гареев И. Ф., Бейлерли О. А., Павлов В. Н. и др. Потенциальная роль микроРНК в патогенезе геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Урология. 2021; 112–19. Доступно по ссылке: <https://dx.doi.org/10.18565/urology.2021.1.112-119>.
 11. Zhou Y, Chen L, Du J, Hu X, Xie Y, Wu J, et al. MicroRNA-7 Inhibits Rotavirus Replication by Targeting Viral NSP5 In Vivo and In Vitro. *Viruses*. 2020; 12 (2). pii: E209. DOI: 10.3390/v12020209.
 12. Chen L, Ming X, Li W, Bi M, Yan B, Wang X, Yang P, Yang B. The microRNA-155 mediates hepatitis B virus replication by reinforcing SOCS1 signalling-induced autophagy. *Cell Biochem Funct*. 2020. DOI: 10.1002/cbf.3488.
 13. Fioravanti A, Cheleschi S, Cavalier E, Reginster J-Y, Alokail M, Ladang A, et al. Can Circulating MicroRNAs, Cytokines, and Adipokines Help to Differentiate Psoriatic Arthritis from Erosive Osteoarthritis of the Hand? A Case-Control Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26 (10): 4621. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms26104621>.
 14. Ali SA, Peffers MJ, Ormseth MJ, Jurisica I, Kapoor M. The non-coding RNA interactome in joint health and disease. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2021; 17: 692–705. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00687-y>.
 15. Shaikh FS, Siegel RJ, Srivastava A, Fox DA, Ahmed S. Challenges and promise of targeting miRNA in rheumatic diseases: A computational approach to identify miRNA association with cell types, cytokines, and disease mechanisms. *Front Immunol*. 2023; 14: 1322806. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1322806>.
 16. Wade SM, McGarry T, Wade SC, Fearon U, Veale DJ. Serum MicroRNA Signature as a diagnostic and therapeutic marker in patients with Psoriatic Arthritis. *J Rheumatol*. 2020; 47: 1760–7. Available from: <https://doi.org/10.3899/jrheum.190602>.
 17. Motta F, Pederzani A, Carena MC, Ceribelli A, Wordsworth PB, De Santis M, et al. MicroRNAs in Axial Spondylarthritis: An overview of the recent progresses in the field with a focus on Ankylosing Spondylitis and Psoriatic Arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2021; 23: 59. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11926-021-01027-5>.
 18. Bonek K, Kuca Wamawin E, Komatka A, Plebanczyk M, Burakowski T, Maslinski W, et al. Circulating miRNA Correlates with lipid profile and disease activity in psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, and ankylosing spondylitis patients. *Biomedicines*. 2022; 10: 893. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040893>.
 19. Haschka J, Simon D, Bayat S, Messner Z, Kampylafka E, Fagni F, et al. Identification of circulating microRNA patterns in patients in psoriasis and psoriatic arthritis. *Rheumatology*. 2023; 62: 3448–58. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kead059>.
 20. Baloun J, Pekacova A, Svec X, Kropackova T, Horvathova V, Hulejova H, et al. Circulating miRNAs in hand osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2023; 31: 228–37. DOI: 10.1016/j.joca.2022.10.021.
 21. Cheleschi S, Tenti S, Bedogni G, Fioravanti A. Circulating Mir-140 and leptin improve the accuracy of the differential diagnosis between psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis: A case-control study. *Transl Res*. 2022; 239: 18–34. DOI: 10.1016/j.trsl.2021.08.001.
 22. Мустафин Р. Н. Идентичность патогенеза, генетических и эпигенетических механизмов развития остеоартрита и ревматоидного артрита. Казанский медицинский журнал. 2024; 105 (5): 797–812. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17816/KMJ627530>.
 23. Law YY, Lee WF, Hsu CJ, Lin YY, Tsai CH, Huang CC, et al. miR-let-7c-5p and miR-149-5p inhibit proinflammatory cytokine production in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Aging (Albany NY)*. 2021; 13 (13): 17227–36. DOI: 10.18632/aging.203201.
 24. Madamsetty Vijay Sagar Mohammadinejad, Reza Uzielienė, Ilona Nabavi, et al. Dexamethasone: insights into pharmacological aspects, therapeutic mechanisms, and delivery systems. *ACS biomaterials science & engineering*. 2022; 8 (5): 1763–90. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.2c00026>.
 25. Байрашева В. К., Пчелин В.Ю., Егорова А.Э., Василькова О.Н., Корнюшин О.В. Экспериментальные модели алиментарного ожирения у крыс. *Juvenis scientia*. 2019; 9–10: 8–13. DOI: 10.32415/jscientia.2019.09-10.02.
 26. Russo A, Bartolini D, et al. Physical Activity Modulates the Overexpression of the Inflammatory miR-146a-5p in Obese Patients. *IUBMB Life*. 2018; 70 (10): 1012–22. DOI: 10.1002/iub.1926.
 27. Воротников А. В., Стафеев Ю. С., Меньшиков М. Ю., Шестакова М. В., Парфенова Е. В. Латентное воспаление и нарушение обновления жировых depot как механизм развития резистентности к инсулину при ожирении. *Биохимия*. 2019; 84 (11): 1649–67. DOI: 10.1134/S0320972519110095.
 28. Chae BS. Effect of low-dose corticosterone pretreatment on the production of inflammatory mediators in super-low-dose LPS-primed immune cells. *Toxicol Res*. 2021; 37: 47–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43188-020-00051-4>.
 29. Rajen Dey, Biswadev Bishayi. Dexamethasone exhibits its anti-inflammatory effects in *S. aureus* induced microglial inflammation via modulating TLR-2 and glucocorticoid receptor expression. *International Immunopharmacology*. 2019; 75: 105806. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105806>.
 30. Волошин Н. И., Пугач В. А., Салухов В. В., Тюнин М. А. Ильинский Н. С., Левчук Е. В., Минаков А. А. Экспериментальное исследование эффективности дексаметазона на модели липополисахарид-индуцированного острого повреждения легких у крыс. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023; 22 (4): 22–30. DOI: 10.20538/1682-0363-2023-4-22-30.

References

1. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105 (30): 10513–8. DOI: 10.1073/pnas.0804549105.
2. Shirshova AN, Shamovskaja DA, Bojarskih UA, Apalko SV, Leskov LS, Sokolov AV, et al. Ocenka znachimosti opredelenija kolichestva miR-146a v plazme krvi cheloveka dlja diagnostiki kolorektalnogo raka. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2017; 4: 31–36. Russian.
3. Gareev IF, Bejlerli OA. Cirkulirujushhie mikroRНК kak biomarkery: kakie perspektivy? *Profilakticheskaja medicina*. 2018; 21 (6): 142–50. Russian.
4. Vasilev SV, Akselrod AS, Zhelankin AV, Shhekokochihin DYU, Generozov JeV, Sharova El, et al. Cirkulirujushhie mikroRНК-21-5r, mikroRНК146a-5r, mikroRНК320a3r u pacientov s fibrillicajej predserdij v sochetanii s gipertonicheskoj bolezn'ju i ishemichej bolezn'ju serdca. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika*. 2022; 21 (1): 2814. Russian.
5. Li Y, Tan W, Ye F, et al. Identification of microRNAs and genes as biomarkers of atrial fibrillation using a bioinformatics approach. *J Intern Med Res*. 2019; 47 (8): 3580–9. DOI:10.1177/0300060519852235.
6. Duan X, Wang L, Sun G, Yan W, Yang Y. Understanding the cross-talk between host and virus in poultry from the perspectives of microRNA. *Poult Sci*. 2020; 99 (4): 1838–46. DOI: 10.1016/j.psj.2019.11.053.
7. Shang R, Lee S, Senavirathne G, Lai EC. MicroRNAs in action: Biogenesis, function and regulation. *Na. Rev Genet*. 2023; 24: 816–33. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y>.
8. Nemeth K, Bayraktar R, Ferracin M, Calin GA. Non-coding RNAs in disease: From mechanisms to therapeutics. *Nat Rev Genet*. 2024; 25: 211–32. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00662-1>.
9. Djachenko NA, Uliina AS, Lukina OV, Pchelina SN, Trofimov VI, Mironova ZhA. Jekspressija mikroRНК miR-21 i miR-146a u pacientov muzhskogo pola s perekrestnym fenotipom bronhial'noj astmy i hronicheskoj obstruktivnoj bolezn'i legkih. *Pul'monologija*. 2020; 30 (3): 263–69. Russian.
10. Gareev IF, Bejlerli OA, Pavlov VN i dr. Potencial'naja rol' mikroRНК v patogeneze gemorragicheskoj lihoradki s pochechnym sindromom. *Urologija*. 2021; 112–19. Russian. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kead059>.

- <https://dx.doi.org/10.18565/urology.2021.1.112-119>.
11. Zhou Y, Chen L, Du J, Hu X, Xie Y, Wu J, et al. MicroRNA-7 Inhibits Rotavirus Replication by Targeting Viral NSP5 In Vivo and In Vitro. *Viruses*. 2020; 12 (2). pii: E209. DOI: 10.3390/v12020209.
 12. Chen L, Ming X, Li W, Bi M, Yan B, Wang X, Yang P, Yang B. The microRNA-155 mediates hepatitis B virus replication by reinforcing SOCS1 signalling-induced autophagy. *Cell Biochem Funct*. 2020. DOI: 10.1002/cbf.3488.
 13. Fioravanti A, Cheleschi S, Cavalier E, Reginster J-Y, Alokail M, Ladang A, et al. Can Circulating MicroRNAs, Cytokines, and Adipokines Help to Differentiate Psoriatic Arthritis from Erosive Osteoarthritis of the Hand? A Case–Control Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26 (10): 4621. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms26104621>.
 14. Ali SA, Peffers MJ, Ormseth MJ, Jurisica I, Kapoor M. The non-coding RNA interactome in joint health and disease. *Nat. Rev. Rheumatol*. 2021; 17: 692–705. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00687-y>.
 15. Shaikh FS, Siegel RJ, Srivastava A, Fox DA, Ahmed S. Challenges and promise of targeting miRNA in rheumatic diseases: A computational approach to identify miRNA association with cell types, cytokines, and disease mechanisms. *Front Immunol*. 2023; 14: 1322806. Available from: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1322806>.
 16. Wade SM, McGarry T, Wade SC, Fearon U, Veale DJ. Serum MicroRNA Signature as a diagnostic and therapeutic marker in patients with Psoriatic Arthritis. *J Rheumatol*. 2020; 47: 1760–7. Available from: <https://doi.org/10.3899/jrheum.190602>.
 17. Motta F, Pederzani A, Carena MC, Ceribelli A, Wordsworth PB, De Santis M, et al. MicroRNAs in Axial Spondylarthritis: An overview of the recent progresses in the field with a focus on Ankylosing Spondylitis and Psoriatic Arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2021; 23: 59. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11926-021-01027-5>.
 18. Bonek K, Kuca Warnawin E, Kornatka A, Plebanczyk M, Burakowski T, Maslinski W, et al. Circulating miRNA Correlates with lipid profile and disease activity in psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis, and ankylosing spondylitis patients. *Biomedicines*. 2022; 10: 893. Available from: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040893>.
 19. Haschka J, Simon D, Bayat S, Messner Z, Kampylafka E, Fagni F, et al. Identification of circulating microRNA patterns in patients in psoriasis and psoriatic arthritis. *Rheumatology*. 2023; 62: 3448–58. Available from: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kead059>.
 20. Baloun J, Pekacova A, Svec X, Kropackova T, Horvathova V, Hulejova H, et al. Circulating miRNAs in hand osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2023; 31: 228–37. DOI: 10.1016/j.joca.2022.10.021.
 21. Cheleschi S, Tenti S, Bedogni G, Fioravanti A. Circulating Mir-140 and leptin improve the accuracy of the differential diagnosis between psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis: A case-control study. *Transl Res*. 2022; 239: 18–34. DOI: 10.1016/j.trsl.2021.08.001.
 22. Mustafin RN. Identichnost' patogeneza, geneticheskikh i epigeneticheskikh mekhanizmov razvitiya osteoartrita i revmatoidnogo artrita. *Kazanskii meditsinskii zhurnal*. 2024; 105(5): 797–812. Russian. Available from: <https://doi.org/10.17816/KMJ627530>.
 23. Law YY, Lee WF, Hsu CJ, Lin YY, Tsai CH, Huang CC, et al. miR-let-7c-5p and miR-149-5p inhibit proinflammatory cytokine production in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Aging (Albany NY)*. 2021; 13 (13): 17227–36. DOI: 10.18632/aging.203201.
 24. Madamsetty Vijay Sagar Mohammadinejad, Reza Uzielienė, Ilona Nabavi, et al. Dexamethasone: insights into pharmacological aspects, therapeutic mechanisms, and delivery systems. *ACS biomaterials science & engineering*. 2022; 8(5): 1763–90. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.2c00026>.
 25. Bairasheva VK, Pchelin BYu, Egorova AE, Vasilkova ON, Komyushin OV. Eksperimental'nye modeli alimentarnogo ozhireniya u kryss. *Juvenis scientia*. 2019; 9–10: 8–13. DOI: 10.32415/jscientia.2019.09-10.02. Russian.
 26. Russo A, Bartolini D, et al. Physical Activity Modulates the Overexpression of the Inflammatory miR-146a-5p in Obese Patients. *IUBMB Life*. 2018; 70 (10): 1012–22. DOI: 10.1002/iub.1926.
 27. Vorotnikov AV, Stafeev YuS, Menshikov MYu, Shestakova MV, Parfenova EV. Latentnoe vospalenie i narushenie obnovleniya zhirovykh depo kak mekhanizm razvitiya rezistentnosti k insulinu pri ozhireнии. *Biokhimiya*. 2019; 84 (11): 1649–67. DOI: 10.1134/S0320972519110095. Russian.
 28. Chae BS. Effect of low-dose corticosterone pretreatment on the production of inflammatory mediators in super-low-dose LPS-primed immune cells. *Toxicol Res*. 2021; 37: 47–57. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43188-020-00051-4>.
 29. Rajen Dey, Biswadev Bishayi. Dexamethasone exhibits its anti-inflammatory effects in *S. aureus* induced microglial inflammation via modulating TLR-2 and glucocorticoid receptor expression. *International Immunopharmacology*. 2019; 75: 105806. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105806>.
 30. Voloshin NI, Pugach VA, Salukhov VV, Tyunin MA, Ilinskii NS, Levchuk EV, et al. Eksperimental'noe issledovanie effektivnosti deksametazona na modeli lipopolisakharid-indutsirovannogo ostrogo povrezhdeniya legkikh u kryss. *Byulleten' sibirskoi meditsiny*. 2023; 22 (4): 22–30. DOI: 10.20538/1682-0363-2023-4-22-30. Russian.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ ОСТРОГО ТЯЖЕЛОГО ОТРАВЛЕНИЯ α -PVP, ОСЛОЖНЕННЫЙ РАЗВИТИЕМ СИНДРОМА СИСТЕМНОГО РАБДОМИОЛИЗА

Н. П. Макаровская^{1,2}, А. Н. Лодягин^{1,2,3}✉, Ч. Б. Батоцыренов⁴, С. Ю. Разамасова³, А. М. Антонова¹, Р. А. Нарзикулов¹, Е. С. Соколова¹

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Научно-клинический центр токсикологии имени С. Н. Голикова, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время острые отравления современными психоактивными веществами и наркотическими веществами входят в число основных причин экстренной госпитализации лиц в отделения токсикологии. Имеется четкая тенденция к росту числа жизнеугрожающих осложнений при отравлениях психоактивными веществами, одним из которых является рабдомиолиз. Представлен клинический случай острого тяжелого отравления альфа-PVP, осложненного развитием системного рабдомиолиза, описаны особенности клинического течения и интенсивной терапии при данной патологии. Ранняя диагностика, своевременное и эффективное лечение путем проведения агрессивной инфузионно-детоксикационной терапии позволили избежать развития анурической стадии острого повреждения почек, а также отказаться от проведения инвазивных процедур экстракорпоральных методов детоксикации и, вероятно, избежать неблагоприятного исхода острого отравления α -PVP, осложненного развитием системного рабдомиолиза.

Ключевые слова: катиноны, альфа-PVP, α -PVP, α -пирролидиноалерофенон, клиника острого отравления, диагностика, лечение, рабдомиолиз

Вклад авторов: Н. П. Макаровская — концепция и дизайн исследования, написание текста, сбор и обработка материала; Ч. Б. Батоцыренов, С. Ю. Разамасова, Р. А. Нарзикулов, Е. С. Соколова — сбор и обработка материала; А. Н. Лодягин — редактирование; А. М. Антонова — описание рентгеновских данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» (протокол № 277 от 23 октября 2023 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Николаевич Лодягин
ул. Будапештская, д. 3, г. Санкт-Петербург, 192242, Россия; alodyagin@mail.ru

Статья получена: 02.10.2025 **Статья принята к печати:** 12.11.2025 **Опубликована онлайн:** 19.11.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.058

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/>).

SEVERE ACUTE α -PVP POISONING COMPLICATED BY SYSTEMIC RHABDOMYOLYSIS SYNDROME: CASE REPORT

Makarovskaya NP^{1,2}, Lodyagin AN^{1,2,3}✉, Batocyrenov ChB⁴, Razamasova SYu³, Antonova AM¹, Narzikulov RA¹, Sokolova ES¹

¹ Dzhanelidze Research Institute of Emergency Care, Saint Petersburg, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

³ Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Golikov Research Center of Toxicology, Saint Petersburg, Russia

Today, acute poisoning with modern psychoactive substances and narcotic drugs is among the major causes of emergency admissions to toxicology units. There is a clear upward trend in the number of life-threatening complications of poisoning with psychoactive substances, one of which is rhabdomyolysis. Here we report a clinical case of severe acute α -PVP poisoning complicated by systemic rhabdomyolysis, describe the features of the clinical course and intensive care for this disorder. The early diagnosis, timely and effective treatment by conducting aggressive detoxification infusion therapy made it possible to prevent progression to the anuric phase of acute kidney injury, as well as to avoid invasive procedures of extracorporeal detoxification methods and probably avoid the adverse outcome of the acute α -PVP poisoning complicated by systemic rhabdomyolysis.

Keywords: cathinones, alpha-PVP, α -PVP, α -pyrrolidinoalerofenone, acute poisoning signs and symptoms, diagnosis, treatment, rhabdomyolysis

Author contribution: Makarovskaya NP — study concept and design, manuscript writing, data acquisition and processing; Batocyrenov ChB, Razamasova SYu, Narzikulov RA, Sokolova ES — data acquisition and processing; Lodyagin AN — editing; Antonova AM — X-ray data description.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (protocol No. 277 dated 23 October 2023).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexej N. Lodyagin
Budapeshtskaya, 3, Saint Petersburg, 192242, Russia; alodyagin@mail.ru

Received: 02.10.2025 **Accepted:** 12.11.2025 **Published online:** 19.11.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.058

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 настоящее время острые отравления наркотическими веществами занимают ведущие позиции в структуре поступления пациентов токсикологического профиля и отсутствует тенденция к снижению их числа, что определяет высокую актуальность проблемы.

К одним из наиболее многочисленных относятся случаи острого отравления синтетическими катинонами (на сленге — «дизайнерские наркотики»), которые

обладают мощным психостимулирующим действием и частым развитием жизнеугрожающих осложнений со стороны ЦНС, дыхательной, сердечно-сосудистой систем [1]. Так, на примере эпидемиологической ситуации в Санкт-Петербурге, в Центр острых отравлений ГБУ «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института скорой помощи им. И. И. Джанелидзе» за 2024 г. было доставлено 2596 пациентов с отравлениями синтетическим катиноном

α -пирролидиновалерофеноном (α -PVP), что значительно превосходит число случаев острых отравлений другими наркотическими средствами, например, метадоном (за 2024 г. поступило 1422 пациентов), кокаином (за аналогичный период было доставлено 68 пациентов). Вышесказанное подчеркивает преобладание острых отравлений α -PVP в структуре острых отравлений в настоящее время.

Впервые свойства α -PVP были описаны в 1963 г. исследователями фармацевтической компании «Boehringer Ingelheim» (Германия) [2]. Однако в дальнейшем подтверждений успешного медицинского применения в лечебных целях α -PVP не было. С начала 2010-х гг. химическое вещество α -PVP появилось на нелегальном наркотическом рынке в странах Европы, где распространялось под видом «солей для ванн» (отсюда одно из названий — «соль»), а затем отмечено его распространение в Москве, Санкт-Петербурге и России [3]. Учитывая социальную опасность данного токсиканта, в настоящее время оборот α -PVP контролируется в 16 странах Евросоюза и запрещен в Российской Федерации [4].

Рекреационные эффекты синтетических катинонов, в том числе α -PVP, связаны с мощным стимулирующим влиянием на ЦНС и сердечно-сосудистую систему. При крайне тяжелых острых отравлениях, помимо токсических поражений нервной и сердечно-сосудистой систем тяжелые состояния отягощают раннее формирование тяжелых метаболических расстройств в виде декомпенсированного метаболического ацидоза, коагулопатии [5, 6]. Одно из наиболее тяжелых осложнений при остром тяжелом отравлении α -PVP — развитие системного рабдомиолиза, как правило, сопровождающееся острым повреждением почек.

Рабдомиолиз — это синдром, характеризующийся некрозом мышц и высвобождением внутриклеточных мышечных компонентов в кровотоки [1]. Развитие системного рабдомиолиза, являющегося одним из наиболее тяжелых осложнений при острых отравлениях, в том числе наркотическими веществами, на данный момент изучено недостаточно [3]. Целью настоящей работы является демонстрация клинического случая острого отравления α -PVP, осложненного развитием системного рабдомиолиза с выявлением ранних диагностических критериев и эффективности проводимой консервативной терапии.

Описание клинического случая

Пациент М., мужчина, 23 лет, поступил в отделение острых отравлений ГБУ «СПб НИИ СП имени И. И. Джанелидзе» с диагнозом направившего учреждения: «Острое отравление неизвестным веществом нейротропного действия средней степени тяжести. Токсическая энцефалопатия». При осмотре у пациента отмечали наличие спутанного сознания, психомоторное возбуждение, дезориентацию в пространстве, времени и собственной личности. Сознание на уровне +3 по шкале RASS. С целью купирования психомоторного возбуждения пациенту был введен препарат элзепам 2,0 мг внутримышечно. Гемодинамика стабильная, частота сердечных сокращений (ЧСС) составляет 125 уд/мин, ритм — синусовая тахикардия, артериальное давление — 150 и 80 мм рт. ст.

При проведении клинико-лабораторных исследований отмечали в общем клиническом анализе крови лейкоцитоз до $26,58 \times 10^{12}/л$ со сдвигом количества нейтрофилов вправо, при биохимическом исследовании крови — повышение уровня креатинина до 227 мкмоль/л и уровня мочевины до 19,7 ммоль/л. В общем анализе

мочи наблюдали протеинурию (с повышением уровня белка до 0,75 г/л), гематурию (с повышением количества эритроцитов до $2,5 \times 10^2/мкл$). По результатам химико-токсикологического исследования методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХМС) в моче обнаружен α -PVP.

Через 12 ч от момента поступления пациент был переведен в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) № 11 связи с ухудшением состояния. При поступлении в ОРИТ общее состояние пациента оценено как тяжелое. Величина зрачков D = S, мидриаз. Реакция зрачков на свет живая. Тонус мышц нормальный. Рефлексы нормальные. Патологических рефлексов нет. Частота дыхательных движений 16 в мин. Сатурация кислорода — 98%. Гемодинамика стабильная, ЧСС — 89 уд./мин, артериальное давление составило 120 и 70 мм рт. ст., центральное венозное давление — (+2) см водн. ст. При катетеризации мочевого пузыря получено 100 мл мочи. Цвет мочи бурый. Был установлен диагноз: «Острое отравление α -PVP тяжелой степени. Токсическая энцефалопатия. Осложнение: системный рабдомиолиз. Острое повреждение почек».

На вторые сутки от момента поступления отмечали снижение числа лейкоцитов до $14,9 \times 10^{12}/л$; в биохимических показателях крови выявлены отрицательная динамика в виде нарастания уровня креатинина до 235 мкмоль/л и мочевины до 25,1 ммоль/л, повышение уровня цитолитических ферментов (АЛТ — до 462,6 ед./л, АСТ — до 1782 ед./л), уровня креатинкиназы — до 88 980 ед./л и гиперкалиемия до 5,4 ммоль/л. Наряду с отрицательными значениями биохимических показателей крови отмечали снижение темпа диуреза до 100 мл/сут., что по классификации KDIGO соответствует 2-й стадии острого повреждения почек [5].

Кроме того, при исследовании газового и кислотно-основного состояния смешанной венозной крови у пациента наблюдали развитие субкомпенсированного метаболического ацидоза с дисэлектролитными расстройствами: pH — 7,285, HCO_3^- — 16 ммоль/л, BEb — (-9,3) ммоль/л, BEect — (-10,6) ммоль/л, Na^+ — 133 ммоль/л, K^+ — 4,49 ммоль/л, Ca^{2+} — 1,018 ммоль/л., осмолярность крови — 266 мОсм/л.

Через 6 часов от начала интенсивной коррекции метаболического ацидоза отмечали положительную динамику ряда показателей: pH — 7,523, HCO_3^- — 27,9 ммоль/л, BEb — 5,1 ммоль/л, BEect — 5,1 ммоль/л, K^+ — 2,87 ммоль/л.

Назначенная инфузионная терапия включала в себя использование инфузионных растворов с целью коррекции метаболического ацидоза (Sol. Natrii hydrocarbonatis 4% — 200,0 № 3). Расчет количества гидрокарбоната натрия проводили по формуле Мелленгаарда-Аstrup: необходимое количество ммоль гидрокарбоната натрия равно произведению массы тела в килограммах на 0,3 на BE (избыток оснований) [7]. Согласно данному расчету, необходимое количество гидрокарбоната составило 297 ммоль, что в пересчете на 4%-й раствор гидрокарбоната натрия равно 623,9 мл. С целью коррекции гиперкалиемии использовали глюкозо-инсулиновый раствор (Sol. Glucosae 10% — 500,0 + Sol. Magnii sulf. 25% — 10,0 + Insulini 2 ED № 3/сут.). С целью коррекции лактатацидоза проводили инфузию Sol. Reamberini 500,0 № 2/сут. С целью коррекции волемического статуса назначили Sol. Natrii chloridi 0,9% — 500,0 № 2/сут. Объем инфузионной терапии рассчитывали с учетом диуреза, который составлял 1 мл/кг/ч (суточный объем при этом достигал 2160 мл), перспирационных потерь из расчета 0,5 мл/кг/ч и гипертермии более

38 °С (0,5 мл/кг/ч — 1580,0). По истечении первых суток госпитализации суточный диурез составил 2900 мл/сут. При этом отмечали изменение цвета мочи с черного до соломенно-желтого. В ответ на проводимую инфузионную терапию на вторые сутки от начала проводимой терапии суточный диурез составил — 3900 мл при центральном венозном давлении (+4) см водн. ст.

На четвертые сутки проводимой интенсивной терапии отмечали положительную динамику в виде снижения уровня реатинкиназы до 35 000 ед./л, снижения уровня цитолитических ферментов (АЛТ до 372,7 ед./л, АСТ до 760 ед./л). В общем клиническом анализе венозной крови выявили снижение количества лейкоцитоза до $6,4 \times 10^{12}$ л. Суточный диурез составил 5200 мл при центральном венозном давлении (+8) см водн. ст.

На пятые сутки лечения в биохимическом анализе крови отмечена положительная динамика в виде снижения уровня креатинина до 183 мкмоль/л, уровня мочевины — до 10,9 ммоль/л, уровня креатинкиназы — до 14 220 ед./л, K^+ — 3,35 ммоль/л. Суточный диурез составил 6200 мл, центральное венозное давление (+8) см водн. ст.

На восьмые сутки пациент был переведен в отделение токсикологии и выписан домой в удовлетворительном состоянии.

Таким образом, ранняя диагностика и своевременное и эффективное проведение интенсивной терапии позволили избежать развития анурической стадии острого повреждения почек и, вероятно, избежать неблагоприятного исхода острого отравления α -PVP, осложненного развитием системного рабдомиолиза.

Обсуждение клинического случая

Данный клинический случай демонстрирует формирование системного рабдомиолиза при остром отравлении α -PVP, который является следствием комбинации прямых и опосредованных факторов, вызывающих раннее развитие этого жизнеугрожающего состояния. Основным эндотоксином при системном рабдомиолизе является миоглобин [8–10]. В норме миоглобин свободно фильтруется в почечных клубочках, однако в условиях метаболического ацидоза и гиповолемии он преципитирует, образуя нерастворимые компартменты, которые обтурируют просвет канальцев, что приводит к миоглобинурийному острому повреждению почек (ОПП),

что и наблюдалось у пациента (изменение цвета мочи до бурого, олигурия, рост креатинина и мочевины). Одним из диагностических маркеров повреждения скелетной мускулатуры является повышение уровня креатинкиназы (КФК), в данном случае отмечалось его повышение до 98 780 ед./л, что являлось диагностическим критерием развития системного рабдомиолиза.

Исходя из вышеизложенного, в основе лечения в данном клиническом случае было проведение агрессивной инфузионно-детоксикационной терапии, направленной на решение быстрой и эффективной коррекции метаболического ацидоза путем применения гидрокарбоната натрия с последующим использованием инфузионного препарата с щелочным резервом — реамберина, проведение массивной инфузионной терапии под строгим контролем центрального венозного давления и темпа диуреза. Общий объем инфузии рассчитывали с учетом дефицита объема, перспирационных потерь и необходимости поддержания достаточного темпа диуреза (> 1 мл/кг/ч) [11]. Это позволило «промыть» почечные канальцы и предотвратить обструкцию миоглобиновыми цилиндрами. Одним из клинических критериев эффективности проводимой терапии были сохранение диуреза и изменение цвета мочи с черного до соломенно-желтого. Быстрая коррекция гиперкалиемии путем применения глюкозо-инсулиновой смеси для устранения гиперкалиемии, возникшей вследствие массивного клеточного распада. Также проведение витаминотерапии, гастропротективной терапии, антикоагулянтной терапии являлось важным компонентом комплексного лечения [12–14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данный клинический случай демонстрирует, что острое отравление α -PVP может приводить к раннему развитию тяжелого системного рабдомиолиза с высоким риском развития острого повреждения почек, метаболическому ацидозу и токсическому поражению ЦНС. Ключевыми факторами благоприятного исхода являются ранняя диагностика системного рабдомиолиза и быстрое и эффективное проведение интенсивной инфузионной терапии, направленной на раннюю и эффективную коррекцию метаболических расстройств и поддержание адекватного почечного кровотока для профилактики необратимого повреждения почек.

Литература

1. Синенченко А. Г., Лодягин А. Н., Шилов В. В., Батоцыренов Б. В., Балабанова О. Л., Шикалова И. А. Анализ структуры острых отравлений современными психоактивными веществами. Гигиена и санитария. 2020; (6): 569–74.
2. Wander A. α -Pyrrolidinovalerophenones; British Patent 403 GB927475; Bern, Switzerland; 1963.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. EMCDDA-Europol. Risk Assessment Report on 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (α -Pyrrolidinovalerophenone, α -PVP); 2016. Доступно по ссылке: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2934/TDAK16001ENN.pdf> [Дата обращения: 10 июля 2024].
4. Zawilska JB, Wojcieszak J. α -Pyrrolidinophenones: a new wave of designer cathinones. Forensic Toxicology. 2017; 35: 201–16.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Kidney Int Suppl. 2012; 2 (1): 1–138.
6. Макаровская Н. П., Лодягин А. Н., Батоцыренов Б. В., Балабанова О. Л., Евдокимова Е.А. Острые отравления катинонами: эпидемиология, патогенез, клиническая картина, диагностика и принципы лечения (обзор литературы). Токсикологический вестник. 2025; 1: 39–49. DOI: 10.47470/0869-7922-2025-33-1-39-49.
7. Amanollahi A, Babeveyneshad T, Sedighi M, et al. Incidence of rhabdomyolysis occurrence in psychoactive substances intoxication: a systematic review and meta-analysis. Scientific Reports. 2023; 13: 17693. DOI: 10.1038/s41598-023-45031-4.
8. Torres PA, Helmstetter JA, Kaye AM, Kaye AD. Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. Ochsner Journal. 2015; 15: 58–69.
9. Cervellini G, Comelli I, Lippi G. Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. Clinical

- Chemistry and Laboratory Medicine. 2010; 48: 749–56.
10. Talaie H, Shahrokhian S, Malekpour F, Azizi F, Ghanei M. Rhabdomyolysis among acute human poisoning cases. *Human & Experimental Toxicology*. 2007; 26: 557–61.
 11. Richards JR, Bretz SW, Johnson EB, Turnipseed SD, Brofeldt BT, Derlet RW. Methamphetamine abuse and emergency department utilization. *Western Journal of Medicine*. 1999; 170: 198–202.
 12. Лодягин А. Н., Батоцыренов Б. В., Нарзикулов Р. А., и др. Острое тяжелое отравление опиоидным наркотическим веществом метадонном, осложненное развитием синдрома длительного сдавления (клинический случай). *Журнал неотложной хирургии имени И. И. Джанелидзе*. 2024; 1 (14): 119–25.
 13. Тепаев Р. Ф., Ластовка В. А., Пыталь А. В., и др. Метаболический ацидоз: диагностика и лечение. *Педиатрическая фармакология*. 2016; 13 (4): 384–89.
 14. Ливанов Г. А., Лодягин А. Н., Разина А. А., Глушков С. И., Иванова А. А., Волчкова Е. В., Батоцыренов Б. В. Благоприятный исход острого тяжелого отравления метадонном (клиническое наблюдение). *Общая реаниматология*. 2018; 14 (5): 25–31.

References

1. Sinenchenko AG, Lodyagin AN, SHilov VV, Batocyrenov BV, Balabanova OL, SHikalova IA. Analiz struktury ostryh otravlenij sovremennymi psihoaktivnymi veshchestvami. *Gigiena i sanitariya*, 2020; (6): 569–74. Russian.
2. Wander A. α -Pyrrolidinovalerophenones; British Patent 403 GB927475; Bern, Switzerland; 1963.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. EMCDDA-Europol. Risk Assessment Report on 1-Phenyl-2-(pyrrolidin-1-yl)pentan-1-one (α -Pyrrolidinovalerophenone, α -PVP); 2016. Available from: <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2934/TDAK16001ENN.pdf> [Data obrashcheniya: 10 iyulya 2024].
4. Zawilska JB, Wojcieszak J. α -Pyrrolidinophenones: a new wave of designer cathinones. *Forensic Toxicology*. 2017; 35: 201–16.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl*. 2012; 2 (1): 1–138.
6. Makarovskaya NP, Lodyagin AN, Batocyrenov BV, Balabanova OL, Evdokimova EA. Ostrye otravleniya katinonami: epidemiologiya, patogenez, klinicheskaya kartina, diagnostika i principy lecheniya (obzor literatury). *Toksikologicheskij vestnik*. 2025; 1: 39–49. DOI: 10.47470/0869-7922-2025-33-1-39-49. Russian.
7. Amanollahi A, Babeveynezhad T, Sedighi M, et al. Incidence of rhabdomyolysis occurrence in psychoactive substances intoxication: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2023; 13: 17693. DOI: 10.1038/s41598-023-45031-4.
8. Torres PA, Helmstetter JA, Kaye AM, Kaye AD. Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Ochsner Journal*. 2015; 15: 58–69.
9. Cervellin G, Comelli I, Lippi G. Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2010; 48: 749–56.
10. Talaie H, Shahrokhian S, Malekpour F, Azizi F, Ghanei M. Rhabdomyolysis among acute human poisoning cases. *Human & Experimental Toxicology*. 2007; 26: 557–61.
11. Richards JR, Bretz SW, Johnson EB, Turnipseed SD, Brofeldt BT, Derlet RW. Methamphetamine abuse and emergency department utilization. *Western Journal of Medicine*. 1999; 170: 198–202.
12. Lodyagin AN, Batocyrenov BV, Narzikulov RA, i dr. Ostroye tyazhlyoe otravlenie opioidnym narkoticheskim veshchestvom metadonom, oslozhnyonnoe razvitiem sindroma dlitel'nogo sdavleniya (klinicheskij sluchaj). *Zhurnal neotlozhnoj hirurgii imeni I. I. Dzhanelidze*. 2024; 1 (14): 119–25. Russian.
13. Tepaev RF, Lastovka VA, Pytal AV, i dr. Metabolicheskij acidoz: diagnostika i lechenie. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2016; 13 (4): 384–89. Russian.
14. Livanov GA, Lodyagin AN, Razina AA, Glushkov SI, Ivanova AA, Volchkova EV, Batocyrenov BV. Blagopriyatnyj iskhod ostrogo tyazhlogo otravleniya metadonom (klinicheskoe nablyudenie). *Obshchaya reanimatologiya*. 2018; 14 (5): 25–31. Russian.

ПОЧВЕННЫЕ ЧЕРВИ КАК ИСТОЧНИК НОВЫХ ПОДХОДОВ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

А. Н. Хохлова^{1,2}, М. В. Вавилов^{1,2}, Т. В. Чепурных¹, Н. С. Родионова³, В. Н. Петушков³, И. В. Ямпольский^{1,4}, М. А. Дубинный¹ ✉

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

² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

³ Институт биофизики Федерального исследовательского центра «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской Академии наук», Красноярск

⁴ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Применение почвенных червей в традиционной медицине имеет многовековую историю и охватывает широкий спектр патологических состояний. Современные исследования сосредоточены в основном на выделении и изучении биологически активных соединений. Среди значимых примеров можно выделить гликопротеин G90 с тромболитическими и противоопухолевыми свойствами, комплекс ферментов лямброкиназы, а также внеклеточный кислородтранспортный белок эритрокруорин, рассматриваемый как основа для разработки заменителей крови. Важную роль играют и модельные организмы, такие как *Caenorhabditis elegans*, используемые для изучения механизмов старения, нейродегенеративных заболеваний и оценки эффективности лекарственных средств. Особый интерес представляют биolumинесцентные системы кольчатых червей, продемонстрировавшие разнообразие химических механизмов свечения и наличие уникальных кофакторов, перспективные для развития практических приложений биомедицины. Совокупность этих направлений подчеркивает значимость червей как источника ферментов, белков, метаболитов и модельных систем, способных решать как фундаментальные, так и прикладные задачи в биомедицине.

Ключевые слова: биolumинесценция, биомедицинские исследования, почвенные черви, *Henlea*, C-маннозил триптофан

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-00421, <https://rscf.ru/project/24-14-00421/>.

Благодарности: авторы благодарят Э. М. Осипову из Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова за ценные критические замечания к рукописи.

Вклад авторов: А. Н. Хохлова, М. В. Вавилов, Т. В. Чепурных — анализ литературы, написание рукописи; Н. С. Родионова, В. Н. Петушков — анализ литературы; И. В. Ямпольский — финансирование и руководство проектом; М. А. Дубинный — финансирование и руководство проектом, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Максим Анатольевич Дубинный
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, Россия; dumkas@yandex.ru

Статья получена: 21.10.2025 **Статья принята к печати:** 29.11.2025 **Опубликована онлайн:** 10.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.067

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/>).

EARTHWORMS AS A SOURCE OF NEW APPROACHES IN BIOMEDICAL RESEARCH

Khokhlova AN^{1,2}, Vavilov MV^{1,2}, Chepurnykh TV¹, Rodionova NS³, Petushkov VN³, Yampolsky IV^{1,4}, Dubinnyi MA¹ ✉

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² HSE University, Moscow, Russia

³ Institute of Biophysics, Krasnoyarsk Research Center, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Traditional medicine has been using earthworms to treat a wide range of pathological conditions for many centuries. Current research focuses primarily on the isolation and characterization of biologically active compounds, including notable examples such as glycoprotein G90, which exhibits thrombolytic and antitumor properties; the enzyme complex lumbrokinase; and the extracellular oxygen transport protein erythrocrucorin, regarded as a potential basis for blood substitute development. Model organisms such as *Caenorhabditis elegans*, which are used to study the mechanisms of aging, neurodegenerative diseases, and evaluate the effectiveness of medicines, also play an important role. Bioluminescent systems of annelids are of particular interest because they exhibit a variety of chemical mechanisms of luminescence and unique cofactors that hold promise for applications in biomedicine. The combination of these properties and abilities underscores the importance of worms as a source of enzymes, proteins, and metabolites, as well as model systems for finding solutions to both fundamental and applied biomedical problems.

Keywords: bioluminescence, biomedical research, earthworms, *Henlea*, C-mannosyl tryptophan

Funding: the work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 24-14-00421, <https://rscf.ru/project/24-14-00421/>.

Acknowledgements: the authors would like to thank Z.M. Osipova from Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry and Yu.A. Ovchinnikov for their valuable critical comments on the manuscript.

Author contribution: Khokhlova AN, Vavilov MV, Chepurnykh TV — literature analysis, manuscript authoring; Rodionova NS, Petushkov VN — literature analysis; Yampolsky IV — financing and project management; Dubinnyi MA — financing and project management, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Maxim A. Dubinnyi
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; dumkas@yandex.ru

Received: 21.10.2025 **Accepted:** 29.11.2025 **Published online:** 10.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.067

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/>).

Использование почвенных червей в лечебной практике с целью терапии различных заболеваний имеет давнюю историю и было широко распространено в традиционной медицине. Экстракты из червей различных видов применяли при аллергических и астматических состояниях, для снижения артериального давления и детоксикации организма, а также в качестве средств с антитромботической, жаропонижающей, диуретической и спазмолитической активностью [1]. Развитие современных методов биохимического и фармакологического анализа позволило перевести эти эмпирические наблюдения в плоскость систематических исследований и целенаправленно выделять биологически активные соединения животного происхождения. Например, в 1992 г. из гомогената тканей дождевых червей был выделен гликопротеин G90, который обладает тромболитическими и противоопухолевыми свойствами. Комплекс фибринолитических ферментов люмброкиназа, источником которого служат также дождевые черви, применяют в качестве пищевой добавки для поддержания работы сердечно-сосудистой системы, поскольку он способен улучшать кровообращение и рассасывать тромбы [1]. Помимо ферментных комплексов, перспективным направлением является разработка заменителей крови на основе эритрокуорина — внеклеточного молекулярного комплекса, являющегося функциональным аналогом гемоглобина, выделенного из кольчатых червей [2]. Эритрокуорин рассматривают как потенциальный переносчик кислорода нового поколения ввиду ряда преимуществ: внеклеточной организации белка, высокой стабильности и низкой подверженности окислительным процессам, широкого температурного диапазона устойчивости, а также способности связывать и переносить монооксид азота, что снижает риск вазоконстрикции и др. [3].

В современных исследованиях червей рассматривают не только как источник биологически активных соединений и белковых комплексов, но и в качестве модельных организмов, например, почвенная нематода *Caenorhabditis elegans*. Короткий жизненный цикл, прозрачное тело, полностью секвенированный геном, низкие требования к условиям культивирования, а также способность за короткое время производить многочисленное потомство посредством самооплодотворения привели к популярности этой модели в качестве инструмента при изучении процессов старения, патогенеза нейродегенеративных заболеваний (например, болезни Альцгеймера), а также при тестировании противоопухолевых и противомикробных препаратов [4].

Развитие биотехнологий сделало возможным применение в биомедицине другого уникального биологического явления, характерного для кольчатых червей, — биолюминесценции, или излучения света живыми организмами. Из двух десятков светящихся кольчатых червей большинство обитает в тропических регионах, однако некоторые встречаются и в Сибири, где их свечение можно наблюдать невооруженным глазом в темное время суток. Практическая значимость изучения биолюминесцентных систем заключается в создании новых аналитических инструментов и совершенствовании методов молекулярной визуализации. Биолюминесцентный биоимиджинг обладает рядом преимуществ перед флуоресцентными методами, в частности, отсутствие необходимости во внешнем источнике возбуждения исключает автофлуоресценцию, снижает фоновый сигнал, а также обеспечивает высокую чувствительность и возможность детекции излучения на уровне отдельных

клеток [5]. В настоящее время применяют лишь несколько люциферинов насекомых и морских организмов, включая D-люциферин, целентеразин и его синтетический аналог фуримазин [6]. Однако активно обсуждается расширение набора люциферин-люциферазных пар для мультицветной визуализации, позволяющей одновременно отслеживать различные молекулярные процессы [7].

Долгое время считалось, что у всех почвенных червей биолюминесценция основана на едином перекисно-зависимом механизме *Diplocardia longa* ($\lambda_{\max} = 490$ нм) (рис. 1А) [8]. В случае *D. longa* свечение представляет собой результат окисления низкомолекулярного субстрата люциферина — N-изовалерил-3-аминопропаналя — в присутствии белка люциферазы. Однако открытие в Сибири трех новых видов — *Fridericia heliota*, *Henlea petushkovi* и *Henlea rodionovae* — показало, что у кольчатых червей существует еще как минимум два отличных механизма свечения [9]. Люциферин *F. heliota* ($\lambda_{\max} = 478$ нм) представляет собой тетрапептид, окисляемый кислородом в присутствии АТФ, Mg^{2+} и люциферазы (рис. 1Б). В *Henlea sp.* ($\lambda_{\max} = 464$ нм) люциферин имеет триптофановую природу и окисляется кислородом в присутствии Ca^{2+} и люциферазы [8] (рис. 1В), а дополнительным усилителем свечения является кофактор F0 (ActH) (структурный аналог рибофлавина), который принимает энергию от возбужденного оксилуциферина и переизлучает ее с 33-кратным усилением и спектральным сдвигом от 410 до 464 нм посредством механизма Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) [10, 11]. Благодаря высокой стабильности люциферина и наличию кофактора-усилителя, именно биолюминесцентная система *Henlea sp.* представляет особый интерес для разработки новых платформ биолюминесцентного биоимиджинга и многоцветного мониторинга внутриклеточных событий.

Дополнительно при анализе метаболитов *Henlea sp.* было обнаружено значительное количество нового для биолюминесцентных систем соединения — α -С-маннозилтриптофана (ManTrp). Спектры поглощения и флуоресценции ManTrp совпадают с таковыми для люциферина *Henlea*, поэтому ManTrp считается его вероятным метаболическим предшественником. Маннозилтриптофан встречается в природе либо в виде свободного мономера ManTrp, либо в составе полипептидной цепи белка как результат необычного С-гликозилирования по второму положению индольного остатка. Механизм С-гликозилирования в составе полипептидной цепи был открыт в 1994 г. на примере РНКазы человека. Мономерный ManTrp был найден в крови и моче человека и других млекопитающих, в том числе мышей и крыс, а также некоторых морских губок [12]. Установлено, что концентрация ManTrp в плазме крови повышается при ряде патологий, включая миелофиброз, сахарный диабет 2-го типа, хронические заболевания почек, рак яичников и нарушения регуляции тромбоцитарного роста. В связи с этими данными можно предположить, что ManTrp станет перспективным биомаркером для диагностики онкологических заболеваний.

В качестве одного из возможных применений люциферин-люциферазной системы *Henlea sp.* можно предложить разработку биолюминесцентной тест-системы для диагностики рака яичников на основе специфического распознавания ManTrp. Изменение BRET-индекса при связывании ManTrp может быть использовано в качестве высокочувствительного диагностического сигнала, а кофактор ActH/F0 обеспечит усиление свечения. Подобные стратегии нашли практическое воплощение

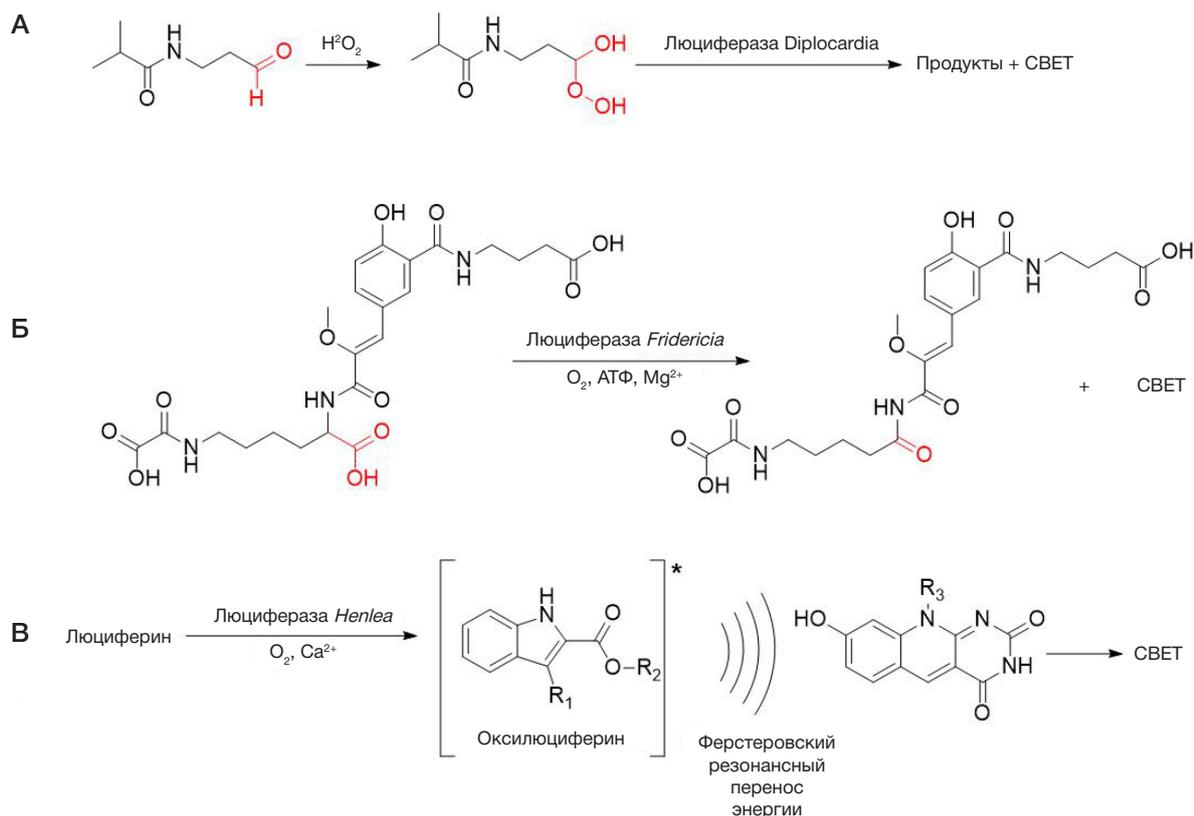


Рис. 1. Схемы биолуминесцентной реакции *D. longae* (А), *F. heliotea* (Б), *Henlea sp.* (В)

в системах «люцифераза–наночастица» в BRET-активируемой фотодинамической терапии [13]. Кроме того, были успешно созданы устойчивые гибридные конструкции, объединяющие наночастицы на основе золота, фермент люциферазу (включая *Phrixotrix hirtus*) и фотосенсибилизатор. Эти биоконъюгаты демонстрируют стабильный биолуминесцентный сигнал и сохраняют функциональную активность в клеточных условиях [14]. Результаты показывают, что люциферазные системы могут быть интегрированы в наноплатформы для совмещения визуализации и активации терапевтических процессов [15]. В перспективе это открывает возможность создания систем молекулярной тераностики на основе ManTrp как диагностического маркера и одновременно триггера свечения активации биолуминесцентной системы.

Таким образом, разработка сенсоров на основе биолуминесцентной системы *Henlea sp.* и специфического распознавания ManTrp может стать основой новых платформ для ранней диагностики и мониторинга рака яичников и других метаболических нарушений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современное применение почвенных червей в медицине вышло за рамки традиционных практик: их использование

эволюционировало от приготовления народных снадобий до целенаправленного скрининга биологически активных соединений с применением современных научных методов. В настоящее время дождевые черви и нематоды рассматривают как источники ферментов и белковых комплексов, а также как модельные организмы, используемые для решения фундаментальных и прикладных задач биомедицины.

Особый интерес представляют биолуминесцентные системы кольчатых червей, отличающиеся разнообразием химических механизмов и уникальными кофакторами. Их изучение не только углубляет понимание эволюции и биохимии свечения, но и открывает путь к созданию новых инструментов молекулярной визуализации [16]. В частности, сочетание люциферин-люциферазных систем с механизмами переноса энергии (например, BRET) делает такие системы потенциально применимыми в фотодинамической терапии (PDT), особенно в случаях, когда требуется генерация света непосредственно внутри клеток организма. Исследование биолуминесцентных систем червей остается важным и перспективным полем современной биологии, объединяющим эволюционные и биохимические аспекты с инновационными приложениями в диагностике, терапии, целевой доставке лекарств и биолуминесцентной визуализации.

Литература

1. Zhu Z, Deng X, Xie W, Li H, Li Y, Deng Z. Pharmacological effects of bioactive agents in earthworm extract: A comprehensive review. *Anim Models Exp Med.* 2024; 7: 653–72. Available from: <https://doi.org/10.1002/ame2.12465>.
2. Elmer J, Palmer AF. Biophysical Properties of *Lumbricus terrestris* Erythrocrurin and Its Potential Use as a Red Blood Cell Substitute. *J Funct Biomater.* 2012; 3: 49–60. Available from: <https://doi.org/10.3390/jfb3010049>.
3. Zimmerman D, Dilusto M, Dienes J, Abdulmalik O, Elmer JJ. Direct comparison of oligochaete erythrocrurins as potential

- blood substitutes. *Bioeng Transl Med.* 2017; 2: 212–21. Available from: <https://doi.org/10.1002/btm2.10067>.
4. Meneely PM, Dahlberg CL, Rose JK. Working with Worms: *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism. *Curr Protoc Essent Lab Tech.* 2019; 19: e35. Available from: <https://doi.org/10.1002/cpet.35>.
 5. Yeh H-W, Ai H-W. Development and Applications of Bioluminescent and Chemiluminescent Reporters and Biosensors. *Annu Rev Anal Chem Palo Alto Calif.* 2019; 12: 129–50. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-115027>.
 6. Close DM, Patterson SS, Ripp S, Baek SJ, Sanseverino J, Saylor GS. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLoS One.* 2010; 5: e12441. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012441>.
 7. Navarro MX, Brennan CK, Love AC, Prescher JA. Caged luciferins enable rapid multicomponent bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol.* 2023; 100: 67–74. Available from: <https://doi.org/10.1111/php.13814>.
 8. Rodionova NS, Rota E, Tsarkova AS, Petushkov VN. Progress in the Study of Bioluminescent Earthworms. *Photochem Photobiol.* 2017; 93: 416–28. Available from: <https://doi.org/10.1111/php.12709>.
 9. Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem Soc Rev.* 2016; 45: 6048–77. Available from: <https://doi.org/10.1039/C6CS00296J>.
 10. Petushkov VN, Vavilov MV, Khokhlova AN, Zagitova RI, Belozerova OA, Shcheglov AS, et al. *Henlea* earthworm bioluminescence comprises violet-blue BRET from tryptophan 2-carboxylate to deazaflavin cofactor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024; 708: 149787. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149787>.
 11. Dubinnyi MA, Ivanov IA, Rodionova NS, Kovalchuk SI, Kaskova ZM, Petushkov VN. α -C-Mannosyltryptophan is a Structural Analog of the Luciferin from Bioluminescent Siberian Earthworm *Henlea* sp. *Chemistry Select.* 2020; 5: 13155–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/slct.202003075>.
 12. Minakata S, Inai Y, Manabe S, Nishitsuji K, Ito Y, Ihara Y. Monomeric C-mannosyl tryptophan is a degradation product of autophagy in cultured cells. *Glycoconj J.* 2020; 37: 635–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09938-8>.
 13. Blum NT, Zhang Y, Qu J, Lin J, Huang P. Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 594491. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.594491>.
 14. Belletti E, Bevilacqua VR, Brito AMM, Modesto DA, Lanfredi AJC, Viviani VR, et al. Synthesis of bioluminescent gold nanoparticle-luciferase hybrid systems for technological applications. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* 2021; 20: 1439–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00111-0>.
 15. Kim Y-P, Daniel WL, Xia Z, Xie H, Mirkin CA, Rao J. Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle-luciferase conjugates. *Chem Commun Camb Engl.* 2010; 46: 76–8. Available from: <https://doi.org/10.1039/b915612g>.
 16. Dunuweera AN, Dunuweera SP, Ranganathan K. A Comprehensive Exploration of Bioluminescence Systems, Mechanisms, and Advanced Assays for Versatile Applications. *Biochem Res Int.* 2024; 2024: 8273237. Available from: <https://doi.org/10.1155/2024/8273237>.

References

1. Zhu Z, Deng X, Xie W, Li H, Li Y, Deng Z. Pharmacological effects of bioactive agents in earthworm extract: A comprehensive review. *Anim Models Exp Med.* 2024; 7: 653–72. Available from: <https://doi.org/10.1002/ame2.12465>.
2. Elmer J, Palmer AF. Biophysical Properties of *Lumbricus terrestris* Erythrocytes and Its Potential Use as a Red Blood Cell Substitute. *J Funct Biomater.* 2012; 3: 49–60. Available from: <https://doi.org/10.3390/jfb3010049>.
3. Zimmerman D, Dilusto M, Dienes J, Abdulmalik O, Elmer JJ. Direct comparison of oligochaete erythrocytes as potential blood substitutes. *Bioeng Transl Med.* 2017; 2: 212–21. Available from: <https://doi.org/10.1002/btm2.10067>.
4. Meneely PM, Dahlberg CL, Rose JK. Working with Worms: *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism. *Curr Protoc Essent Lab Tech.* 2019; 19: e35. Available from: <https://doi.org/10.1002/cpet.35>.
5. Yeh H-W, Ai H-W. Development and Applications of Bioluminescent and Chemiluminescent Reporters and Biosensors. *Annu Rev Anal Chem Palo Alto Calif.* 2019; 12: 129–50. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061318-115027>.
6. Close DM, Patterson SS, Ripp S, Baek SJ, Sanseverino J, Saylor GS. Autonomous bioluminescent expression of the bacterial luciferase gene cassette (*lux*) in a mammalian cell line. *PLoS One.* 2010; 5: e12441. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012441>.
7. Navarro MX, Brennan CK, Love AC, Prescher JA. Caged luciferins enable rapid multicomponent bioluminescence imaging. *Photochem Photobiol.* 2023; 100: 67–74. Available from: <https://doi.org/10.1111/php.13814>.
8. Rodionova NS, Rota E, Tsarkova AS, Petushkov VN. Progress in the Study of Bioluminescent Earthworms. *Photochem Photobiol.* 2017; 93: 416–28. Available from: <https://doi.org/10.1111/php.12709>.
9. Kaskova ZM, Tsarkova AS, Yampolsky IV. 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. *Chem Soc Rev.* 2016; 45: 6048–77. Available from: <https://doi.org/10.1039/C6CS00296J>.
10. Petushkov VN, Vavilov MV, Khokhlova AN, Zagitova RI, Belozerova OA, Shcheglov AS, et al. *Henlea* earthworm bioluminescence comprises violet-blue BRET from tryptophan 2-carboxylate to deazaflavin cofactor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2024; 708: 149787. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.149787>.
11. Dubinnyi MA, Ivanov IA, Rodionova NS, Kovalchuk SI, Kaskova ZM, Petushkov VN. α -C-Mannosyltryptophan is a Structural Analog of the Luciferin from Bioluminescent Siberian Earthworm *Henlea* sp. *Chemistry Select.* 2020; 5: 13155–9. Available from: <https://doi.org/10.1002/slct.202003075>.
12. Minakata S, Inai Y, Manabe S, Nishitsuji K, Ito Y, Ihara Y. Monomeric C-mannosyl tryptophan is a degradation product of autophagy in cultured cells. *Glycoconj J.* 2020; 37: 635–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09938-8>.
13. Blum NT, Zhang Y, Qu J, Lin J, Huang P. Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 594491. Available from: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.594491>.
14. Belletti E, Bevilacqua VR, Brito AMM, Modesto DA, Lanfredi AJC, Viviani VR, et al. Synthesis of bioluminescent gold nanoparticle-luciferase hybrid systems for technological applications. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* 2021; 20: 1439–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00111-0>.
15. Kim Y-P, Daniel WL, Xia Z, Xie H, Mirkin CA, Rao J. Bioluminescent nanosensors for protease detection based upon gold nanoparticle-luciferase conjugates. *Chem Commun Camb Engl.* 2010; 46: 76–8. Available from: <https://doi.org/10.1039/b915612g>.
16. Dunuweera AN, Dunuweera SP, Ranganathan K. A Comprehensive Exploration of Bioluminescence Systems, Mechanisms, and Advanced Assays for Versatile Applications. *Biochem Res Int.* 2024; 2024: 8273237. Available from: <https://doi.org/10.1155/2024/8273237>.