

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. Негребеский, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (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)
В. М. Смирнов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
У. Н. Туманова, д. м. н. (Москва, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
М. А. Чундокова, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н. (Новосибирск, Россия)
А. И. Щеголев, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

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

ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@rsmu.press

СОТРУДНИЧЕСТВО manager@rsmu.press

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2024: 0,7

Журнал включен в WoS. JIF 2024: 0,4

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

Scopus®

WEB OF SCIENCE™

Google
scholar

SJR Scimago Journal & Country Rank 2024: 0,166

Журнал включен в DOAJ

Здесь находится открытый архив журнала

SJR

Scimago Journal & Country Rank

DOAJ

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2026-04

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 31.08.2026
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии PrintFormula
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)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Razumovskii AY, 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)
Skobolina NA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Smirnov VM, DSc, professor (Moscow, Russia)
Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Takhchidi KhP, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Tumanova UN, MD (Moscow, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Chundukova MA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Schegolev AI, MD, professor (Moscow, Russia)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

CORRESPONDENCE editor@rsmu.press

COLLABORATION manager@rsmu.press

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2024: 0.7



Indexed in WoS. JIF 2024: 0.4



Five-year h-index is 11



SCImago Journal & Country Rank 2024: 0.166



Indexed in DOAJ



Open access to archive



Issue DOI: 10.24075/brsmu.2026-04

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 31.08.2026
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

4

Влияние стандартной и фотоактивированной обогащенной тромбоцитами плазмы на фиброхондроциты мениска человека при IL1 β -индуцированном воспалении

К. Б. Керимов, А. С. Иванов, Т. П. Тананакина, С. А. Кащенко, И. А. Погорелова

Effects of standard and photoactivated platelet-rich plasma on human meniscus fibrochondrocytes in IL-1 β -induced inflammation

Kerimov KB, Ivanov AS, Tananakina TP, Kashchenko SA, Pogorelova IA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

14

Полиморфизмы генов тромбоцитарных рецепторов и изменение агрегации тромбоцитов у больных COVID-19 и сахарным диабетом 2-го типа

М. В. Осиков, В. Н. Антонов, С. О. Зотов

Platelet receptor gene polymorphisms and altered platelet aggregation in patients with COVID-19 and type 2 diabetes mellitus

Osikov MV, Antonov VN, Zotov SO

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

23

Интегрированная референсная панель гаплотипов *Macaca mulatta* для импутации генотипов в популяциях смешанного происхождения

Ф. С. Шарко, А. В. Прокопенко, А. О. Изотова, С. В. Тошчаков

Integrated reference panel of *Macaca mulatta* haplotypes for genotype imputation in populations of mixed origin

Sharko FS, Prokopenko AV, Izotova AO, Toshchakov SV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

32

Молекулярно-генетические аспекты прогнозирования ранних репродуктивных потерь

О. В. Юсеф, Б. Р. Ибрагимов, М. П. Клименко, А. А. Герасимова, А. Б. Айметдинова, Е. Г. Марнат, Д. Д. Абрамов, П. А. Клименко, М. А. Курцер

Molecular genetic aspects of predicting early pregnancy loss

Yusef OV, Ibragimov BR, Klimenko MP, Gerasimova AA, Aimetdinova AB, Marnat EG, Abramov DD, Klimenko PA, Kurtser MA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

39

Можно ли обнаружить аутохтонную микробиоту эндометрия при трансцервикальном взятии проб?

Д. Л. Зорников, В. М. Симарзина, Д. К. Исламиди, Н. С. Бельх, Д. О. Корнилов, Е. И. Абакумова, Л. В. Хаютин, Е. Э. Плотко, Е. С. Ворошилина

Can autochthonous endometrial microbiota be detected by transcervical sampling?

Zornikov DL, Simarzina VM, Islamidi DK, Belykh NS, Kornilov DO, Abakumova EI, Khayutin LV, Plotko EE, Voroshilina ES

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

50

Конструирование и характеристика аттенуированных рекомбинантных штаммов вируса гриппа, экспрессирующих интерлейкин-1 β человека

Е. А. Романовская-Романко, О. О. Ожерельева, М. А. Плотникова, А. С. Алтухов, М. А. Стукова

Construction and characterization of the attenuated recombinant influenza virus strains expressing human interleukin 1 β

Romanovskaya-Romanko EA, Ozhereleva OO, Plotnikova MA, Altuhov AS, Stukova MA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

59

FTIR-признаки перестройки белков десневой жидкости у детей при кариесе и гингивите

П. В. Середин, Ю. А. Ипполитов, И. Ю. Ипполитов, Д. Л. Голощапов, Т. А. Литвинова

FTIR signatures of protein conformational changes in gingival crevicular fluid in children with caries and gingivitis

Seredin PV, Ippolitov YuA, Ippolitov IYu, Goloshchapov DL, Litvinova TA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

66

Хроническое утомление у сиблингов детей с онкологическими заболеваниями: самоотчеты детей и наблюдения родителей

Е. Н. Лихоманова, О. В. Шевалдова, А. В. Ковалева

Chronic fatigue in siblings of pediatric cancer survivors: children's self-reports and parents' proxy-reports

Likhomanova EN, Shevaldova OV, Kovaleva AV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

76

Комплексный фармакогностический анализ и оценка антибактериальной активности *Murraya koenigii* (L.) Spreng *in vitro*

Ашвак Т. Карим

Integrative pharmacognostical profiling & *in vitro* antibacterial activity assessment of *Murraya koenigii* (L.) Spreng

Ashwaq T. Kareem

ВЛИЯНИЕ СТАНДАРТНОЙ И ФОТОАКТИВИРОВАННОЙ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ НА ФИБРОХОНДРОЦИТЫ МЕНИСКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ IL1 β -ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ

К. Б. Керимов¹, А. С. Иванов^{1,2,3}✉, Т. П. Тананакина³, С. А. Кашченко³, И. А. Погорелова³

¹ Клиника «МЕДСИ», Клиническая больница № 1, Москва, Россия

² Научно-диагностический центр «Поликлиника на Смоленской», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО ЛГМУ имени Свяителя Луки Минздрава России, Россия

Патогенез дегенеративных изменений мениска важен для понимания и разработки новых методик лечения и включает в себя биохимические, структурные и микроциркуляторные изменения, затрагивающие все структуры сустава. Цель исследования — изучить влияние стандартной и фотоактивированной обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP) *in vitro* на концентрацию IL6, IL17A, экспрессию COL2A1 и маркера апоптоза CD95 фиброхондроцитов мениска человека при IL1 β -индуцированном воспалении. Для эксперимента отобрали хрящевую ткань мениска коленного сустава человека у 12 соматически здоровых доноров от 18 до 35 лет. Клетки разделены на четыре группы: первая — интактная (контроль), вторая, третья и четвертая подвергались воздействию IL1 β для индукции дегенеративных изменений, во вторую вносили 0,9% NaCl, в третью — PRP доноров, в четвертую — PRP с фотоактивацией. Показатели определяли через 48 ч. Статистические расчеты проводили в GraphPad Prism 9. Для связанных групп применяли *rm*-ANOVA. Данные представлены как mean $\pm$ SD, при $p < 0,05$. Во II группе в сравнении с I возрастали IL6 (79,6 $\pm$ 4,3 пг/мл против 28,4 $\pm$ 2,1 пг/мл), IL17A (42,8 $\pm$ 2,5 пг/мл против 14,2 $\pm$ 1,0 пг/мл), CD95 (28,5 $\pm$ 2,2% против 6,8 $\pm$ 0,7%) соответственно; снизился COL2A1 (с 1,00 $\pm$ 0,08 до 0,42 $\pm$ 0,05); в III группе по сравнению со II снижались IL6 до 55,1 $\pm$ 3,4 пг/мл, IL17A — до 29,4 $\pm$ 2,1 пг/мл, CD95 до 17,2 $\pm$ 1,5%, COL2A1 повысился до 0,71 $\pm$ 0,06; IV группе по сравнению с III снижались IL6 до 38,2 $\pm$ 2,6 пг/мл, IL17A — до 18,6 $\pm$ 1,7 пг/мл, CD95 — до 9,4 $\pm$ 0,8%; повысился COL2A1 до 0,94 $\pm$ 0,07 ($p < 0,05$). Стандартная PRP оказывает положительное влияние на ткани мениска *in vitro* через 48 ч. Эффект усиливается после воздействия красного света на PRP.

Ключевые слова: мениск, фиброхондроциты, обогащенная тромбоцитами плазма, PRP, фотоактивация, красный свет, интерлейкин, COL2A1, CD95

Вклад авторов: К. Б. Керимов — дизайн исследования, экспериментальная часть работы, расчеты; А. С. Иванов — дизайн исследования, экспериментальная часть работы; Т. П. Тананакина — дизайн исследования, экспериментальная часть работы, научное сопровождение; С. А. Кашченко — научное редактирование, научное сопровождение, подготовка эксперимента; Погорелова И. А. — техническое редактирование, подготовка эксперимента.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЛГМУ имени Свяителя Луки, МЗ РФ (протокол № 2 от 26 мая 2026 г.), полностью соответствует рекомендации Коллегии ЕЭК «Руководство по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований от 14.11.2023 № 33», принципам Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, а также в соответствии с директивой Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, в научных целях. Все пациенты подписали письменное согласие на использование полученного материала для экспериментальных целей.

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Сергеевич Иванов
ул. А. Дикого, д. 16А, кв. 73, 111396, г. Москва, Россия, sashatratmatolog1985@mail.ru

Статья получена: 27.06.2026 **Статья принята к печати:** 20.08.2026 **Опубликована онлайн:** 26.08.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.046

Авторские права: © 2026 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/>).

EFFECTS OF STANDARD AND PHOTOACTIVATED PLATELET-RICH PLASMA ON HUMAN MENISCUS FIBROCHONDROCYTES IN IL-1 β -INDUCED INFLAMMATION

Kerimov KB¹, Ivanov AS^{1,2,3}✉, Tananagina TP³, Kashchenko SA³, Pogorelova IA³

¹ MEDSI Clinic, Clinical Hospital No. 1, Moscow, Russia

² Scientific and Diagnostic Center "Polyclinic on Smolenskaya", Moscow, Russia

³ St. Luke Lugansk State Medical University, Russia

The meniscus degeneration pathogenesis is important for understanding and developing new treatment methods; it includes biochemical, structural, and microcirculatory alterations affecting all joint structures. The study aimed to perform *in vitro* assessment of the effects of standard and photoactivated platelet-rich plasma (PRP) on the IL6, IL17A concentrations, expression of COL2A1 and CD95 apoptosis marker in human meniscus fibrochondrocytes in the IL1 β -induced inflammation. The human knee meniscus cartilage tissue was collected from 12 somatically healthy donors aged 18 to 35 years for the experiment. Cells were divided into four groups: the first was intact (control), the second, third, and fourth ones were exposed to IL1 β to induce degenerative alterations; the second one was supplemented with 0.9% NaCl, the third one with donor PRP, and the fourth one with photoactivated PRP. Parameters were determined after 48 h. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 9. The *rm*-ANOVA was used for related groups. Data were presented as mean $\pm$ SD, at $p < 0.05$. IL6 (79.6 $\pm$ 4.3 pg/mL vs. 28.4 $\pm$ 2.1 pg/mL), IL17A (42.8 $\pm$ 2.5 pg/mL vs. 14.2 $\pm$ 1.0 pg/mL), CD95 (28.5 $\pm$ 2.2% vs. 6.8 $\pm$ 0.7%) levels increased in group II compared to group I; COL2A1 levels decreased from 1.00 $\pm$ 0.08 to 0.42 $\pm$ 0.5. IL6 levels decreased to 55.1 $\pm$ 3.4 pg/mL, IL17A — to 29.4 $\pm$ 2.1 pg/mL, CD95 — to 17.2 $\pm$ 1.5%, and COL2A1 levels increased to 0.71 $\pm$ 0.06 in group III compared to group II. IL6 levels decreased to 38.2 $\pm$ 2.6 pg/mL, IL17A — to 18.6 $\pm$ 1.7 pg/mL, CD95 — to 9.4 $\pm$ 0.8%, and COL2A1 levels increased to 0.94 $\pm$ 0.07 ($p < 0.05$) in group IV compared to group III. Standard PRP has a positive effect on meniscus tissue *in vitro* after 48 h. The effect is enhanced after the PRP exposure to red light.

Keywords: meniscus, fibrochondrocytes, platelet-rich plasma, PRP, photoactivation, red light, interleukin, COL2A1, CD95

Author contribution: Kerimov KB — study design, experimental procedure, calculations; Ivanov AS — study design, experimental design; Tananagina TP — study design, experimental design, scientific supervision; Kashchenko SA — scientific editing, scientific supervision, part in preparing the experiment; Pogorelova IA — technical proofreading, part in preparing the experiment.

Compliance with ethical standards: the study approved by the Ethics Committee of the St. Luke Lugansk State Medical University (protocol No. 2 dated May 26, 2026) was fully compliant with the Eurasian Economic Commission (EEC) Board "Guidelines for the Use of Laboratory (Experimental) Animals in Preclinical (Non-Clinical) Studies" dated November 14, 2023, No. 33, principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, as well as the Directive of the European Parliament and of the Council of the European Union on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. All the patients submitted the written informed consent for the material collected to be used for experimental purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksey S. Ivanov
A. Dikogo 16A, 73, 111396, Moscow, Russia, sashatratmatolog1985@mail.ru

Received: 27.06.2026 **Accepted:** 20.08.2026 **Published online:** 26.08.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.046

Copyright: © 2026 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/>).

Заболевания опорно-двигательного аппарата с дегенеративно-дистрофическим изменением мениска коленного сустава охватывают широкие слои населения, прежде всего трудоспособного и нередко становятся причиной инвалидности, что обуславливает медико-социальную и экономическую нагрузку для каждого пациента и общества в целом [1]. Патогенез дегенерации мениска включает в себя биохимические, структурные и микроциркуляторные изменения, затрагивающие все структуры сустава, и понимание его важно для разработки новых методик лечения [2]. Дегенеративное поражение хряща развивается в результате комплексного воздействия биологических и механических факторов, приводящих к нарушению суставного гомеостаза, последующему развитию персистирующего воспаления с повышением концентрации провоспалительных цитокинов, инициации процессов апоптоза, снижению экспрессии генов компонентов внеклеточного матрикса, и, в итоге, к уменьшению объема хрящевой ткани и изменению биомеханики сустава [3].

В развитии и прогрессировании дегенеративных изменений тканей мениска значительную роль играют провоспалительные цитокины (IL1 β , IL6, IL8, IL17A и фактор некроза опухолей). IL1 β приводит к угнетению синтеза нового коллагена и протеогликанов в хондроцитах, в том числе за счет активации ферментов металлопротеиназ. Фактор некроза опухолей локально в суставе индуцирует воспаление синовиальной оболочки и апоптоз хондроцитов. IL8 приводит к рекрутированию иммунных клеток (нейтрофилов и макрофагов) в полость сустава, за счет чего повреждение усиливается [4]. IL6 известен не только как фактор развития и прогрессирования воспаления, большое значение имеют его физиологические эффекты. Он продуцируется Т-, В-лимфоцитами, гранулоцитами, клетками гладких мышечных волокон, эозинофилами, тучными, глиальными клетками, кератоцитами и участвует в функционировании эндокринной, кроветворной, нервной систем [5]. В ранее проведенных исследованиях *in vitro* установлена способность IL6 индуцировать ингибиторы матриксных металлопротеиназ [6]. Повышение концентрации цитокина в синовиальной жидкости приводит к усилению боли, потере объема хрящевой ткани, особенно на терминальной стадии остеоартрита [1, 7]. Показано, что при сочетании ожирения и остеоартрита концентрация IL6 в крови пациентов повышена и коррелирует с прогрессированием данных заболеваний [8].

В патогенезе развития дегенеративных изменений ткани мениска коленного сустава важную роль играет IL17A. Продуцируют цитокин макрофаги, а также $\gamma\delta$ -клетки, расположенные в слизистых оболочках, и принимающие участие в противомикробном иммунитете. Есть предположение об участии данных клеток в регенерации костной ткани. При дегенеративных изменениях ткани мениска коленного сустава $\gamma\delta$ -клетки способны приводить к повышенной продукции интерлейкина наравне с NK-клетками, количество которых при остеоартрите повышено в синовиальной оболочке [9]. NK-клетки накапливаются в воспаленных тканях, где их стимулируют другие провоспалительные цитокины (IL12, IL15 и IL18), секретируемые моноцитами. Под действием IL17A происходит подавление анаболических факторов (например, снижается экспрессия гена *COL2A1*) в хондроцитах с последующими дегенеративными изменениями. Так, было установлено, что концентрация

провоспалительных цитокинов значительно снижается у пациентов после тотального эндопротезирования суставов [10–13].

Основным структурным компонентом внеклеточного матрикса является коллаген, обеспечивающий прочность, эластичность, регуляцию и регенерацию соединительной ткани. Коллаген II типа входит в состав хрящевой ткани, являясь основным компонентом альфа-цепи, и кодируется геном *COL2A1* [14, 15]. Тканеспецифический характер экспрессии *COL2A1* является основополагающим фактором в определении клинической картины ассоциированных заболеваний, разделенных на две группы в зависимости от вида пораженной ткани. В первую группу входят нарушения формирования опорно-двигательного аппарата (например, карликовость, кифосколиоз, укорочение конечностей, патологии суставов, нарушения формирования твердого неба) и его функциональная состоятельность во взрослом возрасте (например, остеоартрит суставов различной локализации). Во вторую группу включены внескелетные аномалии (потеря слуха, патология глазного аппарата, например миопия, отслойка сетчатки и др.) [16, 17].

Составляющими процесса дегенерации ткани мениска являются также апоптоз, окислительный стресс, возраст, питание и наследственность [18]. Запуск апоптоза происходит за счет активации рецептора CD95, располагающегося на цитоплазматической мембране клеток и являющегося представителем группы фактора некроза опухолей α (ФНО α) [19]. Запуск рецептора CD95 приводит к появлению мультибелкового комплекса, взаимодействие которого с адапторными молекулами приводит не только к гибели, но и пролиферации клеток. Наиболее часто апоптоз клетки происходит по митохондриальному пути, при котором митохондриальное содержимое попадает в цитоплазму за счет активации белка p53, активации ферментов, фрагментации ДНК, формирования проапоптотических телец и последующего фагоцитоза клетки [20].

Традиционно для лечения хондропатий различного генеза, в том числе при остеоартрите суставов, применяют нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), однако в последнее время все более широкое распространение получает обогащенная тромбоцитами плазма (PRP). В различных исследованиях показано, что PRP способна снижать воспаление и дегенерацию хондроцитов [21–24]. Фотоактивированная PRP усиливает биологическую активность тромбоцитов и их регенераторные способности за счет активного высвобождения факторов роста, содержащихся в альфа-гранулах, в частности за счет трансформирующего фактора роста β 1 (TGF- β 1), фактора роста фибробластов и тромбоцитарного фактора роста [25]. Эффективность применяемого метода лечения продемонстрирована на больших когортах пациентов, наряду с НПВП и глюкокортикостероидами, однако механизм изменения секреторного, фенотипического и матриксного профилей хондроцитов в дегенеративно измененной ткани мениска недостаточно изучен и представляет большой интерес для определения биологических мишеней при применении PRP.

Цель исследования — изучить влияние стандартной и фотоактивированной PRP *in vitro* на концентрацию провоспалительных цитокинов (IL6, IL17A), экспрессию гена коллагена II типа (*COL2A1*) и маркера апоптоза дегенеративных изменений мениска CD95 фиброхондроцитов мениска человека при IL1 β -индуцированном воспалении.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования были использованы хондроциты, выделенные из менисков коленного сустава пациентов; фрагменты менисков были получены при артроскопической резекции в ходе реконструкции передней крестообразной связки. Экспериментальная часть работы была проведена на базе ФГБОУ ВО «ЛГМУ им Св. Луки» МЗ РФ.

Образцы хрящевой ткани мениска были отобраны у 12 соматически здоровых пациентов 18–35 лет. Критерии исключения: наличие у пациентов системных воспалительных заболеваний иммунного и инфекционного генеза; септический артрит; проведение внутрисуставной инъекционной терапии с использованием глюкокортикостероидов на протяжении последнего месяца перед вмешательством. Критерии включения: верифицированное дегенеративное повреждение менисков коленного сустава по данным магнитно-резонансной томографии коленного сустава, подтвержденное при проведении артроскопии; возможность получения достаточного количества образцов ткани в общем количестве 4–8 мм³, используемых в дальнейшем в эксперименте.

Полученные образцы ткани мениска всех 12 доноров промывали в растворах фосфатно-солевого буфера с добавлением пенициллина (100 Ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл), после чего измельчали до 1–2 мм³ и подвергали дальнейшей ферментативной обработке с использованием 0,2% коллагеназы II типа (Thermo Fisher Scientific, США; каталожный номер 17101015, с удельной активностью ≥ 125 U/mg (Mandl units)). Выбор данного фермента обусловлен оптимальным соотношением сопутствующих протеаз, клотрипаина и липаз, необходимых для гидролиза жестких коллагеновых волокон II типа. Дезагрегацию хряща проводили на протяжении 12 ч при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂ и постоянном покачивании. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 70 мкм и в последующем центрифугировали при 1500 об./мин на протяжении 5 мин. Выделенные в результате хондроциты культивировали в среде DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (Модифицированная дьюлбекко среда Игла / Питательная смесь Ф-12)) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% раствора пенициллина и стрептомицина при 37 °C, 5% CO₂. Для проведения экспериментальной части работы использовали клетки 2–3 пассажа. Образцы ткани мениска от каждого донора были разделены на четыре группы [26]: первую группу воздействию не подвергали, на всех остальных образцах было смоделировано дегенеративное повреждение посредством добавления IL1 β , в клетки третьей группы вносили обычную PRP, четвертой — фотоактивированную PRP.

Дегенеративные изменения в клетках вызывали путем воздействия на конъюгированные культуры хондроцитов (80–90%) рекомбинантного человеческого IL1 β (R&D Systems (Bio-Techne, США; каталожный номер: 201-LB-005 на 5 мкг), в концентрации 10 нг/мл на протяжении 48 ч. Выбор данного экспериментального подхода был основан на ранее валидированных моделях остеоартроза и дегенеративного повреждения ткани мениска, при которых демонстрируется IL1 β -опосредованная активация каталитических сигнальных путей, деградация внеклеточного матрикса, продукция провоспалительных цитокинов и активация апоптоза [27].

PRP получали из периферической венозной крови доноров, которым принадлежали ткани мениска, после госпитализации перед проведением медикаментозного и оперативного лечения с целью минимизации воздействия лекарственных препаратов, применяемых при проведении наркоза и последующего лечения. Для обеспечения строгого контроля воспроизводимости метода и исключения контаминации клеточного состава и стандартизации дозирования для получения PRP использовали пробирки Ycellbio (Ycellbio Medical Co., Ltd., Южная Корея) и двухэтапный протокол центрифугирования. Забор цельной крови проводили непосредственно в пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 3,8% раствор цитрата натрия в стандартном соотношении. Цитрат натрия использовали строго в качестве ингибитора преждевременной активации тромбоцитов во время забора крови и фракционирования. Выделение тромбоцитарного концентрата выполняли на специализированной лабораторной центрифуге PLC-02 (Ycellbio Medical Co., Ltd., Республика Корея), оснащенной фиксированным угловым ротором на 45° с максимальным радиусом вращения $R_{\max} = 13,5$ см. Первое центрифугирование проводили при 1500 об./мин (относительное центробежное ускорение — около 300 $\times g$) в течение 10 мин, через несколько секунд проводили второе центрифугирование при 3500 об./мин (относительное центробежное ускорение — около 1650 $\times g$) в течение 10 мин. Полученная в итоге по протоколу производителя PRP содержала $1,0\text{--}1,2 \times 10^6$ тромбоцитов/мкл, что соответствовало увеличению концентрации тромбоцитов в 4–5 раз по сравнению с исходным уровнем периферической крови. Согласно классификации PAW (Platelet, Activation, White blood cells): класс P3-A (высокое концентрирование тромбоцитов, отсутствие предварительной экзогенной активации, наличие лейкоцитарно-эритроцитарной фракции) [28].

Фотоактивацию экспериментальных образцов PRP без клеток хряща проводили путем воздействия красного света с использованием LED-системы фотоактивации (Juventix LED Activator, США) по следующим параметрам: длина волны — 650 ± 10 нм, плотность мощности — 80 мВт/см², полуширина спектра излучения — (FWHM) 20 нм, угол расходимости луча — 120°, время экспозиции — 7 мин, расстояние от источника света — 10 см, температура окружающей среды — 22–24 °C. Стабильность выходной плотности мощности (80 мВт/см²) обеспечивалась прецизионным источником питания тока со встроенной обратной связью по мощности, сертифицированным производителем оборудования. Цель выбранных параметров облучения состояла в высвобождении факторов роста из альфа-гранул тромбоцитов, за счет более интенсивного энергетического воздействия. Данные параметры активации PRP также были подобраны с учетом оптической плотности плазмы (возможность поглощения лучей белками). Сразу после фотоактивации PRP добавляли в культуральную среду, в которой находились хондроциты в конечной концентрации 10% [29].

Распределение биологических образцов, полученных от каждого донора, проводили равномерно по всем экспериментальным группам. Образцы от каждого донора ($n = 12$ биологических единиц (доноров)) были зашифрованы номерами, и лабораторную диагностику проводили слепым методом. Клетки от каждого донора были разделены на четыре экспериментальные группы, для каждой выполняли три технические реплики: первая

(контроль) — интактные хондроциты, экспериментальному воздействию интерлейкина не подвергались; вторая — хондроциты, подвергшиеся действию IL1 β с внесением физиологического раствора натрия хлорида 0,9%; третья — измененные под действием IL1 β клетки с внесением PRP без фотоактивации; четвертая — измененные под действием IL1 β клетки с внесением в них только фотоактивированной PRP. Физиологический раствор натрия хлорида 0,9% и PRP вносили в эквивалентных объемах. Исследование показателей IL6, IL17A, CD95, COL2A1 проводили через 48 ч после начала инкубации клеток с добавлением обычной и фотоактивированной PRP.

Определение концентрации IL6, IL17A проводили при помощи коммерческих наборов R&D Systems (бренд Bio-Techne), линейка: Quantikine ELISA (США), в соответствии с протоколом производителя. Маркер апоптоза CD95 оценивали при помощи метода проточной цитометрии, уровень экспрессии гена COL2A1 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-qPCR).

Определение уровня экспрессии гена COL2A1 (коллагена II типа) выполняли методом количественной ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) в строгом соответствии с международным стандартом MIQE [30].

Экстракцию тотальной РНК образцов хрящевой ткани проводили с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию и чистоту выделенной РНК оценивали спектрофотометрически при помощи NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) по соотношению оптической плотности A260/A280 (в пределах 1,8–2,0). Целостность РНК подтверждали электрофорезом в 1%-м агарозном геле. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли из 1 мкг тотальной РНК с использованием набора RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific, США) с применением смеси олиго (dT) и случайных праймеров.

Для исключения ошибок, связанных с использованием единственного невалидированного референса, нормализацию данных проводили по геометрическому среднему двух стабильных генов человека: GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) и ACTB (β -актин). Специфичные олигонуклеотидные праймеры для человека (NCBI Primer-BLAST) были подобраны на границах экзон-экзонных стыков (intron-spanning) для исключения амплификации геномной ДНК. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch, (Bio-Rad, США) с интеркалирующим красителем SYBR Green с помощью мастер-микса PowerUp SYBR Green Master Mix, (Applied Biosystems, США). Протокол включал денатурацию (95 °C, 2 мин) и 40 циклов: денатурация (95 °C, 15 с), отжиг/элонгация (60 °C, 30 с). Для верификации специфичности продуктов после каждого запуска проводили анализ кривых плавления в диапазоне 65–95 °C; во всех реакциях регистрировали единственный пик плавления без димеров праймеров. Каждую биологическую пробу тестировали в технологических трипликатах с обязательной постановкой контролей без матрицы (NTC) и без обратной транскриптазы (NRT).

Эффективность амплификации (E) определяли по калибровочным кривым пятикратных серийных разведений пула кДНК. Наклон прямых составил от –3,31 до –3,34 ($R_2 > 0,99$), что продемонстрировало высокую и сопоставимую эффективность реакций: (E = 99,1%) для COL2A1, (E = 99,6%) для GAPDH и (E = 98,9%) для ACTB. Относительный уровень экспрессии мРНК гена COL2A1

рассчитывали сравнительным методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [31]. Значение ΔCt определяли, как разность между пороговым циклом гена-мишени и геометрическим средним пороговых циклов референсных генов (Ct_{COL2A1} — геом. среднее Ct_{ref}). Финальное значение кратности изменения экспрессии выражали относительно группы контроля (интактные/здоровые клетки без обработки).

Определение уровня экспрессии мембранного рецептора CD95 методом проточной цитометрии

Оценку относительного количества CD95-позитивных клеток и плотности экспрессии рецептора на мембране проводили с использованием моноклональных мышиных антител против CD95 человека (Mouse Anti-Human CD95, BioLegend, США). Для конъюгации антител применяли флуорохром фикоэритрин (PE) (BioLegend, Inc., США).

Суспензия хондроцитов в количестве 1×10^6 клеток на тест осаждали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 2 mM ЭДТА (буфер для цитометрии). С целью минимизации неспецифического связывания через Fc-рецепторы образцы предварительно инкубировали с реагентом для блокировки Fc-рецепторов (Human TruStain FcX (BioLegend), США), 10 мин при +4 °C. Добавляли моноклональные антитела Anti-CD95 (BioLegend, Inc., США) 5 мкл на тест и инкубировали в течение 30 мин в защищенном от света месте при температуре +4 °C. По окончании инкубации клетки дважды отмывали 1 мл избытка холодного буфера для цитометрии путем центрифугирования ($300 \times g$, 5 мин). Финальный осадок ресуспендировали в 300 мкл буфера. Для исключения артефактов за 5 мин до анализа в пробу вносили витальный краситель — пропидий иодид (PI) (Sigma-Aldrich (Merck), США) в концентрации 1 мкг/мл.

Гейтирование проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) с регистрацией для каждого образца не менее 50 000 целевых событий. Анализ данных проводили при помощи программы FlowJo (FlowJo, LLC (является дочерней компанией корпорации Becton, Dickinson and Company / BD Biosciences), США). Гейтирование живых клеток проводили при помощи построения гистограммы распределения флуоресценции витального красителя PI/7-AAD (Sigma-Aldrich, США; BD Biosciences, США). В дальнейших анализах использовали исключительно краситель отрицательной фракции (PI⁻/7-AAD⁻), полностью исключавший погибшие клетки из анализа уровня экспрессии CD95. Финальное гейтирование проводили на гистограмме флуоресценции в канале детекции PE путем установления пороговой линии (гейта), разделявшей CD95⁻ и CD95⁺-события. Позиционирование границы осуществляли строго по верхней границе флуоресценции изотипического / FMO-контроля (допускалось не более 0,1–0,5% ложноположительных событий в контроле). Оценивали количество в процентах CD95-позитивных клеток и среднюю интенсивность флуоресценции (MFI, Mean Fluorescence Intensity), отражающую плотность рецепторов Fas на клетке.

Анализ данных выполняли в GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad Software, LLC (США) и G*Power 3.1.9.7 (Heinrich Heine University Düsseldorf, Германия). Априорный расчет мощности для модели rm -ANOVA (внутригрупповой фактор, четыре группы, $\alpha = 0,05$, мощность $1-\beta = 0,80$,

Таблица 1. Влияние интерлейкина-1 β на секреторный, фенотипический и матриксный профили хондроцитов мениска человека *in vitro* после 48-часовой инкубации ($M \pm SD$ [95% ДИ], $n = 12$).

Показатель	Контроль	p	IL1 β + 0,9% NaCl	p
IL6 (пг/мл)	28,4 $\pm$ 2,1 [27,1; 29,7]	0,01	79,6 $\pm$ 4,3* [76,9; 82,3]	0,04
IL17A (пг/мл)	14,2 $\pm$ 1,0 [13,6; 14,8]	0,05	42,8 $\pm$ 2,5* [41,2; 44,4]	0,05
CD95 (%)	6,8 $\pm$ 0,7 [6,4; 7,2]	0,04	28,5 $\pm$ 2,2* [27,1; 29,9]	0,05
COL2A1 (2- $\Delta\Delta$ Ct)	1,00 $\pm$ 0,08 [0,95; 1,05]	0,001	0,42 $\pm$ 0,05* [0,39; 0,45]	0,001

Примечание: * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

ожидаемый крупный размер эффекта $f = 0,45$ на основе пилотных данных) определил минимальный объем выборки $n = 10$. В исследование включено 12 индивидуальных доноров хондроцитов. Нормальность распределения оценивали критерием Шапиро–Уилка и Q-Q plots [31], однородность дисперсий — критерием Левена [32], сферичность — критерием Мокли. Для связанных групп применяли *rm*-ANOVA (с поправкой Гринхауса–Гейссера при нарушении сферичности) с указанием *F*-статистики $F(f_{\text{effect}}, df_{\text{error}})$. Учитывая параллельный анализ четырех показателей (IL6, IL17A, CD95, COL2A1), критический уровень значимости для *rm*-ANOVA скорректирован поправкой Бонферрони до $p_{\text{crit}} = 0,0125$. Парные пост-хок сравнения проводили критерием Тьюки ($p < 0,05$), основанным на внутрисубъектной остаточной дисперсии ошибки (MS_{error}). Данные представлены как $\text{Mean} \pm \text{SD}$ и Box-and-Whisker plots с индивидуальными точками. Рассчитывали 95% CI разности средних, частичную эта-квадрат (η^2_p) для группового фактора и d Коэна (d_z) для парных сравнений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под действием IL1 β в хондроцитах мениска человека *in vitro* через 48 ч наблюдалось формирование стабильных иммуно-воспалительных изменений на молекулярном уровне, при которых в значительной степени возрастает концентрация исследуемых провоспалительных цитокинов. Уровень IL6 вырос в 2,8 раза; $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [48,2; 54,2]; $\eta^2 = 0,984$. Аналогичные изменения наблюдали и для концентрации IL17A, которая увеличилась в 3 раза, $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [26,8; 30,4]; $\eta^2 = 0,984$. В культурах клеток доноров, вошедших во вторую группу, процентное содержание CD95-положительных хондроцитов увеличилось в 4,2 раза, $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [20,1; 23,3]; $\eta^2 = 0,980$, что указывает

на процессы инициации апоптоза фиброхондроцитов на фенотипическом уровне. Одновременно экспрессия основного матриксного белка COL2A1 угнеталась в 2,4 раза $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [–0,62; –0,54]; $\eta^2 = 0,954$, что может говорить в пользу угнетения синтеза коллагена и его деградации под действием IL1 β (табл. 1).

Внесение в образцы клеток мениска стандартной PRP приводило к частичному ослаблению индуцированных воспалительных и дегенеративных процессов во всех исследуемых культурах. Наглядно это проявилось в снижении концентрации IL6 в 1,4 раза; $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [–27,1; –21,9]; $\eta^2 = 0,911$, IL17A в 1,5 раза; $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [–15,4; –11,4]; $\eta^2 = 0,879$. На клеточном фенотипическом уровне процентное содержание CD95-положительных клеток уменьшалось в 1,66 раза; $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [–12,8; –9,8]; $\eta^2 = 0,919$. Выросла экспрессия гена COL2A1 в 1,7 раза, $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [0,24; 0,34]; $\eta^2 = 0,896$ (табл. 2).

После внесения фотоактивированной PRP наблюдали статистически значимую регрессию воспалительных изменений хондроцитов во всех исследуемых группах. Произошло снижение IL6 в 1,4 раза; $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [–19,1; –14,7]; $\eta^2 = 0,970$ по сравнению с показателями, полученными при внесении стандартной PRP. Концентрация IL17A снизилась в 1,6 раза; $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [–12,1; –9,5]; $\eta^2 = 0,972$. На фенотипическом уровне после внесения фотоактивированной PRP наблюдали уменьшение процентного количества CD95-положительных клеток в 1,8 раза; $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [–8,4; –7,2]; $\eta^2 = 0,975$ по сравнению с группами клеток, в которые вносили стандартную PRP. Возросла экспрессия гена COL2A1 в 1,3 раза, $p < 0,05$; 95% ДИ разности средних: [0,18; 0,28]; $\eta^2 = 0,931$, что практически сопоставимо с уровнем интактной группы (табл. 3).

Таблица 2. Влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на воспалительный, фенотипический и матриксный профили хондроцитов мениска человека *in vitro* в условиях интерлейкин-1 β -индуцированного воспаления ($M \pm SD$ [95% ДИ], $n = 12$).

Показатель	IL1 β + 0,9% NaCl	p	IL1 β + PRP	p
IL6 (пг/мл)	79,6 $\pm$ 4,3 [76,9; 82,3]	0,04	55,1 $\pm$ 3,4# [52,9; 57,3]	0,001
IL17A (пг/мл)	42,8 $\pm$ 2,5 [41,2; 44,4]	0,05	29,4 $\pm$ 2,1# [28,1; 30,7]	0,05
CD95 (%)	28,5 $\pm$ 2,2 [27,1; 29,9]	0,05	17,2 $\pm$ 1,5# [16,2; 18,2]	0,01
COL2A1 (2- $\Delta\Delta$ Ct)	0,42 $\pm$ 0,05 [0,39; 0,45]	0,001	0,71 $\pm$ 0,06# [0,67; 0,75]	0,04

Примечание: # — $p < 0,05$ по сравнению с группой IL1 β .

Таблица 3. Сравнительный анализ влияния стандартной и фотоактивированной обогащенной тромбоцитами плазмы на воспалительный, фенотипический и матриксный профили хондроцитов мениска человека *in vitro* при интерлейкин-1 β -индуцированном воспалении ($M \pm SD$ [95% ДИ], $n = 12$)

Показатель	IL1 β + PRP	p	IL1 β + фотоактивированная PRP	p
IL6 (пг/мл)	55,1 $\pm$ 3,4 [52,9; 57,3]	0,001	38,2 $\pm$ 2,6 $\dagger$ [36,5; 39,9]	0,01
IL17A (пг/мл)	29,4 $\pm$ 2,1 [28,1; 30,7]	0,05	18,6 $\pm$ 1,7 $\dagger$ [17,5; 19,7]	0,001
CD95 (%)	17,2 $\pm$ 1,5 [16,2; 18,2]	0,01	9,4 $\pm$ 0,8 $\dagger$ [8,9; 9,9]	0,003
COL2A1 (2- $\Delta\Delta C_t$)	0,71 $\pm$ 0,06 [0,67; 0,75]	0,04	0,94 $\pm$ 0,07 $\dagger$ [0,90; 0,98]	0,04

Примечание: $\dagger$ — $p < 0,05$ по сравнению с группой стандартной PRP.

Динамика изменений исследуемых показателей во всех группах культур хряща менисков человека *in vitro* представлена на рисунке.

В сравнении с группой контроля концентрация IL6 во второй группе выросла на 180,3% (2,8 раза), IL17A на 201,4% (в 3 раза), CD95 на 319,1% (в 4,2 раза), COL2A1 снизился на 58,0% (в 2,4 раза) (рис.). Применение стандартной PRP приводит к снижению IL6 на 30,8%, IL17A на 31,3%, CD95 на 39,6%, тогда как COL2A1 вырос на 69,0% в сравнении со второй группой. Применение фотоактивированной PRP приводило по сравнению с показателями во второй группе к снижению уровня провоспалительных цитокинов — IL6 на 52,01% (в 2,08 раза), IL17A на 56,54% (в 2,30 раза) маркера апоптоза CD95 на 67,02% (в 3,03 раза), и росту COL2A1 на 123,81% (в 2,24 раза). При сравнении с показателями в третьей группе эффект фотоактивированной PRP над эффектами от стандартной PRP превалировал: для IL6 — на 30,67% (в 1,44 раза), для IL17A — на 36,73% (в 1,58 раза), для CD95 — на 45,35% (в 1,83 раза) и роста COL2A1 — на

32,39% (1,32 раза), что подтверждается попарным пост-хок-критерием Тьюки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дегенеративные изменения ткани мениска сопровождаются низкоинтенсивным воспалением за счет повышения уровня провоспалительных цитокинов и снижением объема хрящевой ткани [1, 5, 7]. В проведенном исследовании воздействие IL1 β приводит к запуску иммунореакции и дегенерации в ткани мениска *in vitro* уже через 48 ч после инкубации. В пользу этого свидетельствует значительное повышение уровня IL6 и IL17A в сравнении с группой контроля, рост маркера апоптоза и снижение экспрессии гена COL2A1. Это обстоятельство позволяет предположить, что при более длительном воздействии IL1 β способен приводить к более выраженным изменениям, являясь одним из ключевых цитокинов дегенеративного повреждения ткани мениска [8].

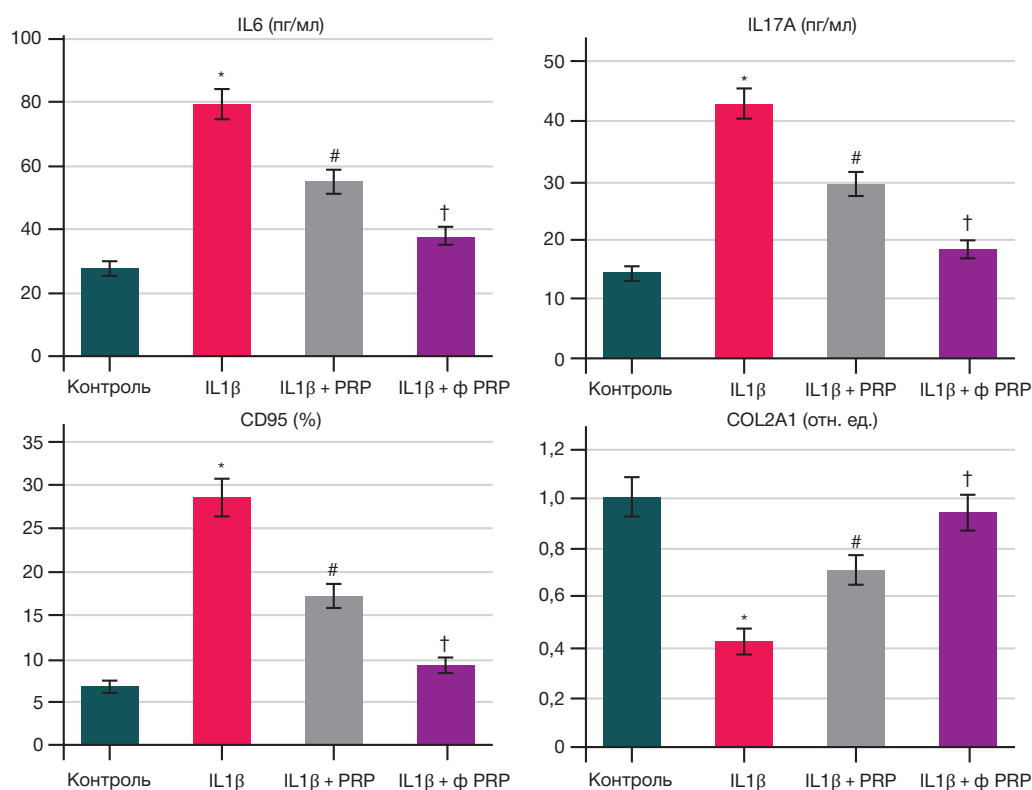


Рис. Воспалительный (IL6, IL17A), фенотипический (CD95) и матриксный (COL2A1) профили хондроцитов мениска человека *in vitro* при IL1 β -индуцированном воспалении и коррекции стандартной и фотоактивированной PRP. Контроль — интактная группа контроля без воздействия IL1 β ; IL1 β + 0,9% NaCl — вторая группа, IL1 β + PRP — третья группа; IL1 β + ф PRP — четвертая группа. Каждая индивидуальная точка на графике соответствует усредненному значению технических реплик для одного из 12 биологических доноров. # — $p < 0,05$ по сравнению с группой «IL1 β »; $\dagger$ — $p < 0,05$ по сравнению с группой «IL1 β + PRP» (пост-хок-критерий Тьюки для повторных измерений)

Выбор гена *COL2A1* как одного из молекулярных показателей дегенеративных изменений фиброзно-хрящевой ткани мениска обусловлен его высокой патогенетической значимостью при моделировании остеоартрита. Ткань мениска гетерогенна за счет преобладания в сосудистой зоне коллагена I типа, обеспечивающего растяжимость; в аваскулярной зоне, которая забиралась нами для исследования, строение близко к гиалиновому хрящу за счет хондроцитоподобных клеток и экспрессии коллагена II типа [33]. При воспалении, ассоциированном с остеоартритом и ожирением, происходит фенотипический сдвиг в клетках мениска, что приводит к процессам апоптоза и снижению синтеза коллагена II типа (*COL2A1*). Этот ген является маркером дегенерации экстрацеллюлярного матрикса аваскулярной зоны мениска и потери амортизирующих свойств, до появления разрывов [34]. Исследование данного показателя позволяет верифицировать способность терапии сохранять хондроцитоподобный фенотип клеток мениска и блокировать катаболический каскад, что невозможно оценить, изолированно анализируя исключительно маркеры фиброзного замещения (коллаген I типа) [35].

Коррекция плазмой, обогащенной тромбоцитами, способна снизить проявления дегенеративных изменений в хондроцитах и приводит к снижению уровня воспалительного процесса наподобие действия нестероидных противовоспалительных препаратов или глюкокортикостероидов [2, 21–24]. При этом PRP не содержит дополнительных химических компонентов, а только тромбоциты, которые помимо регенераторных свойств, способны уменьшать проявление воспаления. В ходе эксперимента установлено снижение концентрации IL6 и IL17A и маркера CD95, увеличение уровня экспрессии *COL2A1* за счет биологической активности PRP. Отдельные исследования *in vitro* и *ex vivo* говорят о том, что PRP способна приводить к пролиферации хондроцитов. Этот процесс может идти в ущерб зрелым клеткам, которые в подобных условиях проявляют свойства фибробластов, снижающих экспрессию *COL2A1*, и синтезируют фиброзный коллаген I типа (*COL2A1*) [36], что в проведенной работе не подтвердилось.

Использование фотоактивированной плазмы, как установлено в проделанном эксперименте, приводит к еще большему усилению биологической активности и регенеративных способностей тромбоцитов. Это может происходить за счет активного высвобождения тромбоцитарных факторов роста, которые депонированы в альфа-гранулах, и модуляции воспалительных сигнальных путей. Ключевую роль в процессах регенерации фиброзно-хрящевой ткани и уменьшении повреждения играют трансформирующий фактор роста β -1 (TGF- β 1), фактор роста фибробластов (bFGF/FGF2) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) [24, 25]. Полученные молекулярно-генетический и клеточный эффекты особенно значимы были в четвертой группе — снижение уровней IL6, IL17A и CD95, увеличение экспрессии гена *COL2A1* произошли практически до показателей интактных хондроцитов первой группы. Снижение уровня провоспалительных цитокинов происходит за счет ингибирования ключевого провоспалительного транскрипционного фактора NF- κ B (ядерного фактора каппа-Би). Под действием PRP блокируются фосфорилирование и деградация ингибиторного белка I κ B, что впоследствии приводит к выключению генов провоспалительных цитокинов. Фотоактивация приводит к усилению подобного

эффекта за счет активации цитохром-с-оксидазы митохондрий, стимуляции аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и кратковременного высвобождения активных форм кислорода, активирующего эндогенные противовоспалительные факторы. Активация каскада фосфорилирования приводит к ингибированию проапоптотических белков семейства Bcl-2 (Bax и Bad), блокировке транскрипционного фактора FoxO, в результате происходит деактивация рецепторов CD95 и дальнейший запуск эффекторных каспаз [37].

Увеличение экспрессии гена *COL2A1* при добавлении фотоактивированной PRP происходит за счет активации сигнального пути Smad2/3 под действием TGF- β 1, связывающегося с рецепторами TGFBR1/TGFBR2, в результате чего происходит фосфорилирование белков Smad2 и Smad3; в результате полученный комплекс транслоцируется в область ядра и связывается с промотором гена SOX9, отвечающего за хондрогенез. В активированном состоянии ген приводит к запуску каскада экспрессии мРНК *COL2A1*, что приводит к увеличению синтеза коллагена II типа и плотности внеклеточного матрикса мениска [38]. Применение стандартной PRP имеет меньший потенциал в отношении *COL2A1* в сравнении с фотоактивированной формой, так как имеет меньшую кинетику дегрануляции. Резкая и избыточная пролиферативная стимуляция хондроцитов стандартной PRP способна вызвать их транзиторную дифференцировку, приводящую к угнетению синтеза ключевых структурных маркеров [39]. Фотоактивированная плазма при нарушении протокола облучения может иметь перестроенную кинетику дегрануляции, что обеспечивает растянутое во времени высвобождение факторов роста (PDGF, bFGF). Их избыток приводит к непрерывному делению хондроцитов, обуславливающему выключение анаболического синтеза клеточного матрикса *COL2A1* и ACAN [25].

Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют в пользу возможности применения обогащенной тромбоцитами плазмы по стандартной методике и с фотоактивацией для регенерации хрящевой ткани и ее применения при реконструктивных операциях на менисках и хондропластике.

Ограничения исследования

Исключительно высокая величина эффекта ($\eta^2 = 0,879–0,984$) и низкая междонорная вариабельность ($CV \approx 5–8\%$) для человеческого материала обусловлены жесткой биологической стандартизацией (использование клеток раннего пассажа, синхронизация клеточного цикла) и математической спецификой модели *rm*-ANOVA. Данный дизайн изолирует индивидуальную вариабельность доноров из дисперсии ошибки, что закономерно завышает долю дисперсии (η^2_p), объясняемую групповым фактором, и может ограничивать прямую экстраполяцию данных *in vivo*.

Выводы

В процессе проведенного исследования установлено, что воздействие IL1 β на культуру хондроцитов ткани мениска человека *in vitro* приводит к увеличению концентрации в ней провоспалительных цитокинов IL6, IL17, маркера апоптоза CD95⁺-клеток и снижению уровня экспрессии гена *COL2A1*. Данные изменения демонстрируют иммунорегуляторный паттерн с запуском апоптоза хондроцитов и деградации

экстрацеллюлярного матрикса в хряще под воздействием IL1 β . Применение PRP, обладающей биологической активностью и регенеративным потенциалом за счет высокого содержания тромбоцитов, способно снижать выраженность воспаления и апоптоза в хрящевой ткани и положительно влияет на регенерацию и синтез коллагена II типа, т. е. эффективно влияет на секреторный (IL6, IL17A), матриксный (COL2A1) и фенотипический (CD95) профили фиброхондроцитов мениска человека при IL1 β -индуцированном воспалении *in vitro*. В исследовании было показано, что фотоактивированная PRP способна оказывать более выраженную биологическую

активность в отношении всех изучаемых параметров за счет более активного высвобождения факторов роста из тромбоцитов и снижения уровня воспаления и апоптоза клеток, сопровождается нормализацией секреторного, фенотипического и матриксного профилей. Дальнейшее изучение влияния обычной и фотоактивированной PRP в клинической практике с разработкой оптимальных сроков и кратности внутрисуставного введения позволит более точно оценить механизм регенерации хондроцитов при выборе методов клеточной терапии у пациентов с дегенеративным поражением хрящевой ткани мениска, в том числе при остеоартрите.

Литература

1. Гладкова Е. В., Иванов А. Н. Взаимосвязь структурных нарушений суставного гиалинового хряща и параметров системных проявлений воспалительной реакции в патогенезе ранних стадий первичного остеоартроза. Саратовский научно-медицинский журнал. 2018; 14 (3): 518–23. Доступно по ссылке: <https://cyberleninka.ru/article/n/vzaimosvyaz-strukturnykh-narusheniy-sustavnogo-gialinovogo-hryascha-i-parametrov-sistemnykh-proyavleniy-vospalitelnoy-reaktsii-v> (дата обращения: 27.06.2026).
2. Иванов А. С., Тананакина Т. П., Кащенко С. А., Погорелова И. А. Экспрессия микроРНК miR146a в плазме крови крыс с ожирением и артрозом коленного сустава на фоне введения дексаметазона. Вестник РГМУ. 2025; 6: 223–9. DOI: 10.24075/vrgmu.2025.056.
3. Плехова Н. Г., Кабалык М. А., Просекова Е. В., Шуматов В. Б. Провоспалительные цитокины, хемокин CXCL17 и белки теплового шока при остеоартрите коленного сустава. Российский иммунологический журнал. 2025; 28 (1): 129–34. DOI: 10.46235/1028-7221-16975-PCC.
4. Chow YY, Chin KY. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. Mediators Inflamm. 2020; 2020: 8293921. DOI: 10.1155/2020/8293921.
5. McGregor NE, Murat M, Elango J, Poulton IJ, Walker EC, et al. IL6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. J Biol Chem. 2019; 294 (19): 7850–63. DOI: 10.1074/jbc.RA119.008074.
6. Vadalà G, Di Giacomo G, Ambrosio L, Cannata F, Cicione C, Papalia R, Denaro V. Irisin Recovers Osteoarthritic Chondrocytes In Vitro. Cells. 2020; 9 (6): 1478. DOI: 10.3390/cells9061478.
7. Li L, Li Z, Li Y, Hu X, Zhang Y, et al. Profiling of inflammatory mediators in the synovial fluid related to pain in knee osteoarthritis. BMC Musculoskelet Disord. 2020; 21 (1): 99. DOI: 10.1186/s12891-020-3120-0.
8. Федулчев Н. П. Провоспалительные цитокины в патогенезе остеоартрита. Университетская клиника. 2024; 4 (53): 70–81. Доступно по ссылке: <https://cyberleninka.ru/article/n/provospalitelnye-tsitokiny-v-patogeneze-osteoartrita> (дата обращения: 27.06.2026).
9. Jaime P, García-Guerrero N, Estella R, Pardo J, GarcíaÁlvarez F, et al. CD56+/CD16- Natural Killer cells expressing the inflammatory protease granzyme are enriched in synovial fluid from patients with osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2017; 25 (10): 1708–18. DOI: 10.1016/j.joca.2017.06.007.
10. Mimpfen JY, Carr AJ, Dakin SG, Snelling SJ. Inhibition of interleukin-17-induced effects in osteoarthritis — An in vitro study. Osteoarthritis Cartilage. 2018; 26: S118. DOI: 10.1016/j.joca.2018.02.258.
11. Babaei M, Javadian Y, Narimani H, Ranaei M, Heidari B, et al. Correlation between systemic markers of inflammation and local synovitis in knee osteoarthritis. Caspian J Intern Med. 2019; 10 (4): 383–7. DOI: 10.22088/cjim.10.4.383.
12. Snelling SJ, Bas S, Puskas GJ, Dakin SG, Suva D, et al. Presence of IL17 in synovial fluid identifies a potential inflammatory osteoarthritic phenotype. PLoS One. 2017; 12 (4): e0175109. DOI: 10.1371/journal.pone.0175109.
13. Lee YH, Song GG. Association between IL17 gene polymorphisms and circulating IL17 levels in osteoarthritis: a meta-analysis. Z Rheumatol. 2020; 79 (5): 482–90. DOI: 10.1007/s00393-019-00720-2.
14. Дыдыкина И. С., Коваленко П. С., Коваленко А. А., Аболешина А. В. Значение неденатурированного коллагена для нормализации функции хрящевой ткани суставов. Медицинский совет. 2022; 16 (14): 145–53. DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-14-145-153.
15. Zhang B, Zhang Y, Wu N, Li J, Liu H, Wang J. Integrated analysis of COL2A1 variant data and classification of type II collagenopathies. Clin Genet. 2020; 97: 383–95. DOI: 10.1111/cge.13680.
16. Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. Am J Med Genet A. 2019; 179 (12): 2393–419. DOI: 10.1002/ajmg.a.61366.
17. Viakhireva I, Bychkov I, Markova T, Shatokhina O, Karandasheva K, Udalovala V, Bekhtereva Y, Ryzhkova O, Skoblov M. The molecular complexity of COL2A1 splicing variants and their significance in phenotype severity. Bone. 2024; 181: 117013. DOI: 10.1016/j.bone.2024.117013.
18. Huan Yu, Sai Yao, Chengchong Zhou, Fangda Fu, Huan Luo, Weibin Du, et al. Morroniside attenuates apoptosis and pyroptosis of chondrocytes and ameliorates osteoarthritic development by inhibiting NF- κ B signaling. Journal of Ethnopharmacology. 2021; 266: 113447. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113447.
19. Hussain A, Tarahomi T, Singh L, Bollampally M, Heydari-Kamjani M, Kesselman MM. Cardiovascular Risk Associated with TNF Alpha Inhibitor Use in Patients with Rheumatoid Arthritis. Cureus. 2021; 13 (9): e17938. DOI: 10.7759/cureus.17938.
20. Абрамова Т. Я., Блинова Е. А., Пашкина Е. А., Гришина Л. В., Ильина Н. А., Чумасова О. А., Сизиков А. Э., Козлов В. А. Исследование эффекторных молекул автономного и неавтономного влияния апоптоза Т-лимфоцитов в условиях «клеточного соседства» в культуре у здоровых людей и пациентов с РА. Медицинская иммунология. 2022; 24 (6): 1119–38. DOI: 10.15789/1563-0625-SOE-2527.
21. Bagmut IYu, Ivanov OS, Sheremet MI, Smirnov SM, Kolisnyk IL, Ivanova JV, et al. Isolation of megakaryocytes using magnetic cell separation and adverse effects induced by diclofenac toxicity in an experiment. J Med Life. 2022; 15 (1): 65–70. DOI: 10.25122/jml-2020-0129.
22. Ivanov O, Haidash O, Voloshin V, Kondratov S, Smirnov A. Influence of the acting substance sodium diclofenac on bone marrow cells. Georgian Medical News. 2020; 306: 137–42. PMID: 33130661.
23. Ivanova YuV, Gramatiuk SM, Kryvoruchko IA, Prasol VO, Pulyaeva IS, Miasoiedov KV, et al. The Effect of pulsed photobiomodulation on proliferation and migration of human mesenchymal stem cells in vitro. Clinical and preventive medicine. 2024; (5): 87–92. DOI: 10.31612/2616-4868.5.2024.11.
24. Медведев В. Л., Ополский А. М., Коган М. И. Перспективы

- развития регенеративных технологий. Современные знания об аутоплазме, обогащенной тромбоцитами и возможности ее применения в лечении урологических заболеваний. Кубанский научный медицинский вестник. 2018; 25 (3): 155–61. DOI: 10.25207/1608-6228-2018-25-3-155-161.
25. Irmak G, Gümüşderelioglu M. Photo-activated platelet-rich plasma (PRP)-based patient-specific bio-ink for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater*. 2020; 15 (6): 065010. DOI: 10.1088/1748-605X/ab9e46.
 26. Gramatiuk S, Kryvoruchko I, Ivanova Y, Emily Hubbard, Maria Noebauer-Babenko, Karine Sargsyan. Artificial Intelligence-Based Quality Control of Cell Lines. *Biopreserv Biobank*. 2025; DOI: 10.1177/19475535251367317.
 27. Li Y, Wang F, Ji B, Amati A, Cao L. FHL2 deteriorates IL-1 β induced inflammation, apoptosis, and extracellular matrix degradation in chondrocyte-like ATDC5 cells by mTOR and NF- κ B pathways. *BMC Musculoskelet Disord*. 2025; 26 (1): 331. DOI: 10.1186/s12891-025-08536-9.
 28. Collins T, Alexander D, Barkatali B. Platelet-rich plasma: a narrative review. *EFORT Open Rev*. 2021; 6 (4): 225–35. DOI: 10.1302/2058-5241.6.200017.
 29. Mishra Kanchan, Desai Pooja, Khanna Manish, Malhotra Sayesha. Photoactivated platelet-rich plasma (PA-PRP): A safe and effective treatment for musculoskeletal disorders. *IP International Journal of Orthopaedic Rheumatology*. 2025; 11: 71–75. DOI: 10.18231/j.ijor.25218.1765359797.
 30. Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clin Chem*. 2025; 71 (6): 634–51. DOI: 10.1093/clinchem/hvaf043.
 31. Videla-Jiménez P, Ruz F, López-Martín M. Research on box plot knowledge in statistical education: a systematic review of the literature. *Eur J Psychol Educ*. 2025; 40: 141. DOI: 10.1007/s10212-025-01048-z.
 32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
 33. Raut RD, Chakraborty AK, Neogi T, Michael Albro, Brian Snyder, Thomas P. Schaer, et al. A multi-tissue human knee single-cell atlas identifies that osteoarthritis reduces regenerative tissue stem cells while increasing inflammatory pain macrophages. *Commun Biol*. 2025; 8: 1146. DOI: 10.1038/s42003-025-08586-8.
 34. Mocanu V, Timofte DV, Zără-Dăncănu C-M, Labusca L, Obesity. Metabolic Syndrome, and Osteoarthritis Require Integrative Understanding and Management. *Biomedicines*. 2024; 12: 1262. DOI: 10.3390/biomedicines12061262.
 35. Galicia-Canales BE, del Rocío Aguilar-Gaytán M, Álvarez-Pérez MA, Jarquín-Yáñez K, et al. Effect of pericacerol on human meniscal fibrochondrocyte inflammation induced by IL-1 β and TNF- α through the NF- κ B signaling pathway. *Cellular and Molecular Biology*. 2026; 72 (3): 36–44. DOI: 10.14715/cmb/2025.72.3.5.
 36. Rijkers M, Dijkstra K, Terhaard BF, Admiraal J, Levato R, Malda J, et al. Platelet-Rich Plasma Does Not Inhibit Inflammation or Promote Regeneration in Human Osteoarthritic Chondrocytes In Vitro Despite Increased Proliferation. *Cartilage*. 2021; 13 (2_suppl): 991S–1003S. DOI: 10.1177/1947603520961162.
 37. Zhao H, Zhu W, Mao W, Shen C. Platelet-rich plasma inhibits Adriamycin-induced inflammation via blocking the NF- κ B pathway in articular chondrocytes. *Mol Med*. 2021; 27 (1): 66. DOI: 10.1186/s10020-021-00314-2.
 38. O'Donnell C, Migliore E, Grandi FC, et al. Platelet-Rich Plasma (PRP) From Older Males With Knee Osteoarthritis Depresses Chondrocyte Metabolism and Upregulates Inflammation. *J Orthop Res*. 2019; 37: 1760–70. DOI: 10.1002/jor.24322.
 39. Li M, Jing C, Liu Q, Zhang Y, Li K. Platelet-rich plasma in cartilage repair: biological mechanisms and clinical perspectives. *Front Sports Act Living*. 2026; 8: 1785754. DOI: 10.3389/fspor.2026.1785754.

References

1. Gladkova EV, Ivanov AN. Vzaimosvyaz' strukturnykh narushenij sustavnogo gialinovogo hryashcha i parametrov sistemnykh proyavlenij vospalitel'noj reakcii v patogeneze rannih stadij pervichnogo osteoartritoza. *Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal*. 2018; 14 (3): 518–23. Dostupno po ssylke: [https://cyberleninka.ru/article/n/vzaimosvyaz-strukturnykh-narusheniy-sustavnogo-gialinovogo-hryashcha-i-parametrov-sistemnykh-proyavleniy-vospalitel'noy-reaktsii-v-\(data-obrashcheniya:27.06.2026\)](https://cyberleninka.ru/article/n/vzaimosvyaz-strukturnykh-narusheniy-sustavnogo-gialinovogo-hryashcha-i-parametrov-sistemnykh-proyavleniy-vospalitel'noy-reaktsii-v-(data-obrashcheniya:27.06.2026).). Russian.
2. Ivanov AS, Tananakiina TP, Kashchenko SA, Pogorelova IA. Expression of microRNA miR146a in the blood plasma of rats with obesity and knee arthrosis after administration of dexamethasone. *Bulletin of RSMU*. 2025; 6: 209–15. DOI: 10.24075/brsmu.2025.056.
3. Plekhova NG, Kabalyk MA, Prosekova EV, Shumatov VB. Provospalitel'nye citokiny, hemokin CXSL17 i belki teplovogo shoka pri osteoartrite kolennogo sustava. *Rossiiskij immunologicheskij zhurnal*. 2025; 28 (1): 129–34. DOI: 10.46235/1028-7221-16975-PCC. Russian.
4. Chow YY, Chin KY. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2020; 2020: 8293921. DOI: 10.1155/2020/8293921.
5. McGregor NE, Murat M, Elango J, Poulton IJ, Walker EC, et al. IL6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2019; 294 (19): 7850–63. DOI: 10.1074/jbc.RA119.008074.
6. Vadalà G, Di Giacomo G, Ambrosio L, Cannata F, Cicione C, Papalia R, Denaro V. Irisin Recovers Osteoarthritic Chondrocytes In Vitro. *Cells*. 2020; 9 (6): 1478. DOI: 10.3390/cells9061478.
7. Li L, Li Z, Li Y, Hu X, Zhang Y, et al. Profiling of inflammatory mediators in the synovial fluid related to pain in knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020; 21 (1): 99. DOI: 10.1186/s12891-020-3120-0.
8. Fedulichev NP. Provospalitel'nye citokiny v patogeneze osteoartrita. *Universitetskaya klinika*. 2024; 4 (53): 70–81. Dostupno po ssylke: [https://cyberleninka.ru/article/n/provospalitel'nye-tsitokiny-v-patogeneze-osteoartrita-\(data-obrashcheniya:27.06.2026\)](https://cyberleninka.ru/article/n/provospalitel'nye-tsitokiny-v-patogeneze-osteoartrita-(data-obrashcheniya:27.06.2026).). Russian.
9. Jaime P, García-Guerrero N, Estella R, Pardo J, GarcíaÁlvarez F, et al. CD56+/CD16- Natural Killer cells expressing the inflammatory protease granzyme are enriched in synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017; 25 (10): 1708–18. DOI: 10.1016/j.joca.2017.06.007.
10. Mimpen JY, Carr AJ, Dakin SG, Snelling SJ. Inhibition of interleukin-17-induced effects in osteoarthritis — An in vitro study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018; 26: S118. DOI: 10.1016/j.joca.2018.02.258.
11. Babaei M, Javadian Y, Narimani H, Ranaei M, Heidari B, et al. Correlation between systemic markers of inflammation and local synovitis in knee osteoarthritis. *Caspian J Intern Med*. 2019; 10 (4): 383–7. DOI: 10.22088/cjim.10.4.383.
12. Snelling SJ, Bas S, Puskas GJ, Dakin SG, Suva D, et al. Presence of IL17 in synovial fluid identifies a potential inflammatory osteoarthritic phenotype. *PLoS One*. 2017; 12 (4): e0175109. DOI: 10.1371/journal.pone.0175109.
13. Lee YH, Song GG. Association between IL17 gene polymorphisms and circulating IL17 levels in osteoarthritis: a meta-analysis. *Z Rheumatol*. 2020; 79 (5): 482–90. DOI: 10.1007/s00393-019-00720-2.
14. Dydykina IS, Kovalenko PS, Kovalenko AA, Aboleshina AV. Znachenie nadenaturirovannogo kollagena dlya normalizatsii funktsii hryashchevoj tkani sustavov. *Medicinskij sovet*. 2022; 16 (14): 145–53. DOI: 10.21518/2079-701X-2022-16-14-145-153. Russian.
15. Zhang B, Zhang Y, Wu N, Li J, Liu H, Wang J. Integrated analysis of COL2A1 variant data and classification of type II collagenopathies. *Clin Genet*. 2020; 97: 383–95. DOI: 10.1111/cge.13680.
16. Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, et al. Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2019 revision. *Am J Med Genet A*. 2019; 179 (12): 2393–419. DOI: 10.1002/ajmg.a.61366.
17. Viakhireva I, Bychkov I, Markova T, Shatokhina O, Karandasheva K,

- Udalova V, Bekhtereva Y, Ryzhkova O, Skoblov M. The molecular complexity of COL2A1 splicing variants and their significance in phenotype severity. *Bone*. 2024; 181: 117013. DOI: 10.1016/j.bone.2024.117013.
18. Huan Yu, Sai Yao, Chengchong Zhou, Fangda Fu, Huan Luo, Wein Du, et al. Morroniside attenuates apoptosis and pyroptosis of chondrocytes and ameliorates osteoarthritic development by inhibiting NF- κ B signaling. *Journal of Ethnopharmacology*. 2021; 266: 113447. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113447.
 19. Hussain A, Tarahomi T, Singh L, Bollampally M, Heydari-Kamjani M, Kesselman MM. Cardiovascular Risk Associated with TNF Alpha Inhibitor Use in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Cureus*. 2021; 13 (9): e17938. DOI: 10.7759/cureus.17938.
 20. Abramova TYa, Blinova EA, Pashkina EA, Grishina LV, Ilina NA, Chumasova O. A., i dr. Issledovanie effektivnykh molekul avtonomnogo i neavtonomnogo vliyaniya apoptoza T-limfocitov v usloviyakh «kletchnogo sosledstva» v kul'ture u zdorovykh lyudey i pacientov s RA. *Meditsinskaya immunologiya*. 2022; 24 (6): 1119–38. DOI: 10.15789/1563-0625-SOE-2527. Russian.
 21. Bagmut IYu, Ivanov OS, Sheremet MI, Smirnov SM, Kolisnyk IL, Ivanova JV, et al. Isolation of megakaryocytes using magnetic cell separation and adverse effects induced by diclofenac toxicity in an experiment. *J Med Life*. 2022; 15 (1): 65–70. DOI: 10.25122/jml-2020-0129.
 22. Ivanov O, Haidash O, Voloshin V, Kondratov S, Smirnov A. Influence of the acting substance sodium diclofenac on bone marrow cells. *Georgian Medical News*. 2020; 306: 137–42. PMID: 33130661.
 23. Ivanova YuV, Gramatiuk SM, Kryvoruchko IA, Prasol VO, Pulyaeva IS, Miasoedov KV, et al. The Effect of pulsed photobiomodulation on proliferation and migration of human mesenchymal stem cells in vitro. *Clinical and preventive medicine*. 2024; (5): 87–92. DOI: 10.31612/2616-4868.5.2024.11.
 24. Medvedev VL, Opolskij AM, Kogan MI. Perspektivy razvitiya regenerativnykh tekhnologij. *Sovremennye znaniya ob autoplazme, obogashchennoi trombocitami i vozmozhnosti ee primeneniya v lechenii urologicheskikh zabolevaniy*. Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik. 2018; 25 (3): 155–61. DOI: 10.25207/1608-6228-2018-25-3-155-161.
 25. Irmak G, Gümüşderelioğlu M. Photo-activated platelet-rich plasma (PRP)-based patient-specific bio-ink for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater*. 2020; 15 (6): 065010. DOI: 10.1088/1748-605X/ab9e46.
 26. Gramatiuk S, Kryvoruchko I, Ivanova Y, Emily Hubbard, Maria Noebauer-Babenko, Karine Sargsyan. Artificial Intelligence-Based Quality Control of Cell Lines. *Biopreserv Biobank*. 2025; DOI: 10.1177/19475535251367317.
 27. Li Y, Wang F, Ji B, Amati A, Cao L. FHL2 deteriorates IL-1 β induced inflammation, apoptosis, and extracellular matrix degradation in chondrocyte-like ATDC5 cells by mTOR and NF- κ B pathways. *BMC Musculoskelet Disord*. 2025; 26 (1): 331. DOI: 10.1186/s12891-025-08536-9.
 28. Collins T, Alexander D, Barkatali B. Platelet-rich plasma: a narrative review. *EFORT Open Rev*. 2021; 6 (4): 225–35. DOI: 10.1302/2058-5241.6.200017.
 29. Mishra Kanchan, Desai Pooja, Khanna Manish, Malhotra Sayesha. Photoactivated platelet-rich plasma (PA-PRP): A safe and effective treatment for musculoskeletal disorders. *IP International Journal of Orthopaedic Rheumatology*. 2025; 11: 71–75. DOI: 10.18231/j.ijor.25218.1765359797.
 30. Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clin Chem*. 2025; 71 (6): 634–51. DOI: 10.1093/clinchem/hvaf043.
 31. Videla-Jiménez P, Ruz F, López-Martín M. Research on box plot knowledge in statistical education: a systematic review of the literature. *Eur J Psychol Educ*. 2025; 40: 141. DOI: 10.1007/s10212-025-01048-z.
 32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
 33. Raut RD, Chakraborty AK, Neogi T, Michael Albro, Brian Snyder, Thomas P. Schaer, et al. A multi-tissue human knee single-cell atlas identifies that osteoarthritis reduces regenerative tissue stem cells while increasing inflammatory pain macrophages. *Commun Biol*. 2025; 8: 1146. DOI: 10.1038/s42003-025-08586-8.
 34. Mocanu V, Timofte DV, Zără-Dănceanu C-M, Labusca L, Obesity. Metabolic Syndrome, and Osteoarthritis Require Integrative Understanding and Management. *Biomedicines*. 2024; 12: 1262. DOI: 10.3390/biomedicines12061262.
 35. Galicia-Canales BE, del Rocío Aguilar-Gaytán M, Álvarez-Pérez MA, Jarquín-Yáñez K, et al. Effect of penicicrol on human meniscal fibrochondrocyte inflammation induced by IL-1 β and TNF- α through the NF- κ B signaling pathway. *Cellular and Molecular Biology*. 2026; 72 (3): 36–44. DOI: 10.14715/cmb/2025.72.3.5.
 36. Rikkers M, Dijkstra K, Terhaard BF, Admiraal J, Levato R, Malda J, et al. Platelet-Rich Plasma Does Not Inhibit Inflammation or Promote Regeneration in Human Osteoarthritic Chondrocytes In Vitro Despite Increased Proliferation. *Cartilage*. 2021; 13 (2_suppl): 991S–1003S. DOI: 10.1177/1947603520961162.
 37. Zhao H, Zhu W, Mao W, Shen C. Platelet-rich plasma inhibits Adriamycin-induced inflammation via blocking the NF- κ B pathway in articular chondrocytes. *Mol Med*. 2021; 27 (1): 66. DOI: 10.1186/s10020-021-00314-2.
 38. O'Donnell C, Migliore E, Grandi FC, et al. Platelet-Rich Plasma (PRP) From Older Males With Knee Osteoarthritis Depresses Chondrocyte Metabolism and Upregulates Inflammation. *J Orthop Res*. 2019; 37: 1760–70. DOI: 10.1002/jor.24322.
 39. Li M, Jing C, Liu Q, Zhang Y, Li K. Platelet-rich plasma in cartilage repair: biological mechanisms and clinical perspectives. *Front Sports Act Living*. 2026; 8: 1785754. DOI: 10.3389/fspor.2026.1785754.

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ ТРОМБОЦИТАРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И ИЗМЕНЕНИЕ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ COVID-19 И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

М. В. Осиков^{1,2}, В. Н. Антонов^{2,3}, С. О. Зотов^{1,3}✉¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия² Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия³ Областная клиническая больница № 3, Челябинск, Россия

COVID-19 характеризуется диффузным альвеолярным повреждением легких (COVID-19-АПЛ). Особого внимания заслуживают изменения гемостаза при COVID-19, проявлениями которых выступают венозные и артериальные тромбозы. Проблема особенно актуальна у больных с сахарным диабетом. Цель наблюдательного исследования — оценить роль полиморфизмов генов *ITGB3*, *ITGA2* и *GP1BA* в изменении агрегации тромбоцитов у больных с COVID-19-АПЛ в сочетании с сахарным диабетом второго типа (СД 2). В контрольную группу вошли клинически здоровые добровольцы (группа 1; $n = 22$). В зависимости от наличия СД 2 больные с COVID-19-АПЛ поделены на группы: группа 2 без СД 2 ($n = 52$) и группа 3 с СД 2 ($n = 56$). Агрегацию тромбоцитов оценивали на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «АЛАТ-2», в качестве индукторов агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 2,5 мкг/мл, коллаген 2,0 мкг/мл, адреналин 5 мкг/мл и ристомидин 7,5 мг/мл. Скорость формирования агрегатов при индукции АДФ у больных с COVID-19-АПЛ и СД 2 выше у носителей Т/С- и С/С-вариантов по сравнению с Т/Т-вариантом на 14 и 23% по медиане ($p < 0,05$). Полиморфизмы определяли методом полимеразной цепной реакции в Buccalном соскобе эпителия. В группе больных COVID-19-АПЛ без СД 2 в зависимости от полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* при вариантах С/Т и Т/Т по сравнению с С/С ускоряется коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов — на 55 и 49% соответственно ($p < 0,05$); при COVID-19-АПЛ с СД 2 у носителей Т/Т-варианта скорость коллаген-индуцированной агрегации выше на 30% по сравнению с носителями С/С-варианта ($p < 0,05$). Вывод: у больных COVID-19-АПЛ и СД 2 наличие мутантного аллеля Т полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* и аллеля С полиморфизма rs5918 гена *ITGB3* увеличивает скорость коллаген- и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Ключевые слова: COVID-19, тромбоциты, агрегация, полиморфизмы, генотип, аллели**Вклад авторов:** М. В. Осиков, В. Н. Антонов — планирование исследования; С. О. Зотов — анализ литературы, сбор, анализ и интерпретация данных.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 24 мая 2021 г., протокол № 2 от 05 марта 2026 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие.✉ **Для корреспонденции:** Семён Олегович Зотов
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092, Россия; semenz2007@yandex.ru**Статья получена:** 18.05.2026 **Статья принята к печати:** 15.07.2026 **Опубликована онлайн:** 28.07.2026**DOI:** 10.24075/vrgmu.2026.041**Авторские права:** © 2026 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/>).

PLATELET RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND ALTERED PLATELET AGGREGATION IN PATIENTS WITH COVID-19 AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Osikov MV^{1,2}, Antonov VN^{2,3}, Zotov SO^{1,3}✉¹ South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia² Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia³ Regional Clinical Hospital No. 3, Chelyabinsk, Russia

COVID-19 is characterized by diffuse alveolar damage (COVID-19-DAD). The COVID-19-associated hemostatic alterations manifested by venous and arterial thrombosis deserve special attention. The issue is especially urgent for patients with diabetes mellitus. An observational study aimed to assess the role of polymorphisms of the genes *ITGB3*, *ITGA2*, and *GP1BA* in aggregation alteration in patients having COVID-19-DAD combined with type 2 diabetes mellitus (T2D). The control group included healthy volunteers (group 1; $n = 22$). Patients with COVID-19-DAD were divided into two groups based on the fact of having or not having T2D: group 2 with no T2D ($n = 52$) and group 3 with T2D ($n = 56$). Platelet aggregation was assessed with the ALAT-2 laser platelet aggregation analyzer; adenosine diphosphate (ADP) at a concentration of 2.5 µg/mL, collagen 2.0 µg/mL, adrenaline 5 µg/mL, and ristomycin 7.5 mg/mL were used as aggregation inducers. In patients with COVID-19-DAD and T2D, the rate of aggregate formation with the ADP induction was higher in carriers of the T/C and C/C variants compared to carriers of the T/T variant — by 14 and 23% based on the median ($p < 0.05$). Polymorphisms were determined by polymerase chain reaction in buccal epithelial scrapings. In the group of patients with COVID-19-DAD having no T2D, depending on the *ITGA2* gene rs1126643 polymorphism the collagen-induced platelet aggregation is accelerated with the C/T and T/T variants compared to the C/C variant — by 55 and 49%, respectively ($p < 0.05$); among individuals with COVID-19-DAD and T2D, carriers of the T/T variant show the rate of the collagen-induced platelet aggregation 30% higher compared to carriers of the C/C variant ($p < 0.05$). Conclusion: in patients with COVID-19-DAD and T2D, the presence of the mutant allele T of the *ITGA2* gene rs1126643 polymorphism and allele C of the *ITGB3* gene rs5918 polymorphism increases the rate of the collagen- and ADP-induced platelet aggregation.

Keywords: COVID-19, platelets, aggregation, polymorphisms, genotype, alleles**Author contribution:** Osikov MV, Antonov VN — study planning; Zotov SO — literature review, data acquisition, analysis, and interpretation.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the South Ural State Medical University (protocol No. 4 dated May 24, 2021, protocol No. 2 dated March 5, 2026). All patients submitted the informed consent.✉ **Correspondence should be addressed:** Semen O. Zotov
Vorovsky, 64, Chelyabinsk, 454092, Russia; semenz2007@yandex.ru**Received:** 18.05.2026 **Accepted:** 17.07.2026 **Published online:** 28.07.2026**DOI:** 10.24075/brsmu.2026.041**Copyright:** © 2026 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/>).

Выраженность проявлений COVID-19-АПЛ обусловлена в том числе генетическим разнообразием пациентов. В настоящее время продолжается активный поиск маркеров генетического детерминирования тяжести течения и исходов COVID-19. Основной массив исследований касается полиморфизмов генов ангиотензинпревращающих ферментов и мембранно-связанной сериновой протеазы (*TMPRSS2*), имеются данные о влиянии на течение COVID-19 полиморфизмов генов молекул адгезии эндотелиоцитов, эпоксиредуктазного комплекса витамина К, компонентов системы интерферона, цитокинов и факторов транскрипции, окислительного стресса, метаболических молекул и некоторых других факторов [1–4].

В то же время COVID-19-АПЛ может протекать как с осложнениями, связанными с системой гемостаза, так и без них; часть пациентов чувствительна к антикоагулянтной терапии, другая часть — нет. Для определения функции тромбоцитов целесообразно исследовать их молекулярно-генетическую основу и вклад в осложнения, связанные с тромбообразованием при COVID-19. Высокая частота тромботических осложнений при тяжелых формах COVID-19-АПЛ связана с гиперреактивностью тромбоцитов в условиях альтерации таких генов, как *GP1BA* (glycoprotein Ib-alpha), *ITGB3* (integrin beta 3) и *ITGA2* (integrin alpha 2) [5].

Ряд проведенных ранее исследований не выявил различий по влиянию на тромбоциты у полиморбидных лиц с полиморфизмами генов *ITGA2* и *ITGB3*, получены противоречивые сведения о вкладе генов *F2*, *NLRP3*, *TLR4*, *CX3CR*, *IL1RN* и *IL1B* в течение COVID-19 [6]. Полиморфизмы в генах, регулирующих систему гемостаза, могут помочь выявить различия в восприимчивости и тяжести у разных пациентов. Однако конкретные генетические факторы и степень, в которой они могут объяснить вариации в восприимчивости и тяжести течения COVID-19-АПЛ, остаются неясными.

У пациентов с СД 2-го типа (СД 2) гипергликемия и инсулинорезистентность вызывают повышение продукции тромбоцитов и их активацию, качественные и количественные изменения факторов свертывания и фибринолиза, что усугубляет дисфункцию гемостаза [7]. Однако у пациентов с COVID-19-АПЛ и СД 2 выявляются изменения гемостаза и наблюдается значительная функциональная вариабельность отдельных его компонентов, что может быть связано в том числе с полиморфизмами генов факторов.

Клинико-патогенетические аспекты гемостаза при COVID-19, особенно в сочетании с СД 2, изучены недостаточно, однако достоверно известно, что генетические факторы оказывают влияние на изменение функции звеньев гемостаза. Тромбогеморрагические осложнения при COVID-19 представляют актуальную медико-социальную проблему, несмотря на окончание пандемии, в связи с их значимым влиянием на прогноз и качество жизни больных, возникновение осложнений и отсроченную летальность. Чтобы понять механизмы тяжелого течения и возникновения тромбогеморрагических осложнений при COVID-19 с СД 2, следует использовать клинико-лабораторные, инструментальные и математические методы для исследования роли генетических факторов в изменении показателей гемостаза.

Цель работы — оценить роль полиморфизмов генов *ITGB3*, *ITGA2* и *GP1BA* в изменении агрегации тромбоцитов у больных с COVID-19-ассоциированным поражением легких в сочетании с СД 2.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 108 пациентов с COVID-19, госпитализированных в ГАУЗ ОКБ № 3 г. Челябинск (50 женщин и 58 мужчин), в возрасте от 45 до 74 лет, не принимавших перед госпитализацией антикоагулянты и другие препараты с влиянием на гемостаз. У всех пациентов методом мультиспиральной компьютерной томографии грудной клетки на аппарате «Siemens SOMATOM Definition AS 64» (Siemens AG, Германия) выявлены двустороннее диффузное уплотнение легочной ткани по типу «матового стекла» и консолидации в сочетании с ретикулярными изменениями (объем поражения легочной ткани 11–64%). Диагноз COVID-19 подтверждали обнаружением на слизистых оболочках зева и носовой полости РНК вируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции (РеалБест РНК SARS-CoV-2; «Вектор Бест», Россия), больные соответствовали критериям среднетяжелого и тяжелого течения заболевания согласно клиническим рекомендациям актуальной версии [8]. В контрольную группу вошли 22 клинически здоровых добровольца (группа 1), сопоставимых по полу и возрасту с больными COVID-19. В зависимости от наличия СД 2 больные с COVID-19-АПЛ были поделены на группы: группа 2 без СД 2 ($n = 52$) и группа 3 с СД 2 ($n = 56$). Критерии включения в группу 3: наличие клинического диагноза СД 2 со стажем заболевания 1–5 лет (с целью исключения осложнений СД 2 — ангиопатий), достигнутыми целевыми уровнями глюкозы крови и гликированного гемоглобина. Критерии исключения: наличие онкологических, аутоиммунных заболеваний, хронических заболеваний сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной систем, органов желудочно-кишечного тракта и почек; крайне тяжелое течение COVID-19-АПЛ, требующее госпитализации пациента в ОРИТ; развитие бактериальной и/или другой вирусной инфекции, наличие у пациента артериальной гипертензии 3-й степени и выше, индекс массы тела (ИМТ) более 35 кг/м², анемия (гемоглобин менее 119 г/л).

Забор крови проводили на 7-е сутки поступления больного в стационар. Стандартная тромбопрофилактика всем исследуемым лицам была единообразна и состояла из подкожного введения низкомолекулярного гепарина (эноксапарин натрия 4 тыс. анти-Ха МЕ (40 мг) 2 раза в день на весь период госпитализации). Помимо антикоагулянтной терапии больные получали стандартную терапию фавибирином и глюкокортикоидами, антибактериальную терапию.

Для оценки выраженности воспаления при COVID-19-АПЛ концентрацию С-реактивного белка в сыворотке определяли на иммуноферментном анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology Inc., США) с помощью тест-системы АО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия), лактат крови — с использованием анализатора кислотно-щелочного состояния «EasyLyte Plus» (Medica Corporation, США). Количество тромбоцитов в крови, их морфологические характеристики определяли на анализаторе «Mindray BC 5800» (Mindray Co. Ltd., Китай). В плазме определяли концентрацию фибриногена (г/л), концентрацию Д-димера (мг/л) с использованием коагулометра «АПГ4 – 02П» (ООО «ЭМКО», Россия) и тест-систем («Технология-Стандарт», Россия).

Исследовали полиморфизмы генов, продукты которых участвуют в агрегации тромбоцитов и плазменном гемостазе. Исследования одиночных полиморфизмов проводили методом ПЦР в реальном времени (Roche

Таблица 1. Основные клинические, лабораторные и инструментальные показатели исследуемых групп при госпитализации

Показатель	Группа 2 COVID-19-АПЛ, n = 52	Группа 3 COVID-19-АПЛ + СД 2, n = 56	p_{1-2}
Возраст, лет [Me (Q_{25} ; Q_{75})]	59,3 (55,8; 67,2)	61,1 (55,4; 68,6)	0,48
Мужской пол, n (%)	28 (53,8)	30 (53,6)	0,872
Женский пол, n (%)	24 (46,2)	26 (46,4)	0,87
Количество пациентов с ДН, n (%)	43 (82,7)	48 (85,7)	0,67
I степень, n (%)	35 (67,3)	34 (60,7)	0,26
II степень, n (%)	8 (15,4)	14 (25,0)	0,33
ИМТ, кг/м ² [Me (Q_{25} ; Q_{75})]	26,7 (21,5; 30,4)	31,2 (28,5; 33,4)	0,040 *
SpO ₂ , % [Me (Q_{25} ; Q_{75})]	93,2 (89,4; 96,1)	91,0 (86,3; 93,6)	0,74
Лактат, ммоль/л [Me (Q_{25} ; Q_{75})]	1,86 (1,21; 2,26)	2,47 (2,01; 3,12)	0,003 *
СРБ, мг/л [Me (Q_{25} ; Q_{75})]	97,7 (71,2; 120,8)	123,4 (101,5; 162,5)	0,010 *
D-димер, мг/л [Me (Q_{25} ; Q_{75})]	1,39 (0,81; 2,11)	2,65 (1,87; 3,13)	0,040 *
Тромбоциты, × 10 ⁹ /л	346,00 (245,00; 422,00)	275,00 (204,00; 316,50)	0,010 *
Фибриноген, г/л	3,31 (2,88; 5,07)	5,84 (4,34; 7,19)	0,016 *

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1.

LightCycler 96; Roche Molecular Systems, США), материал — буккальный соскоб эпителия. Использовали наборы реагентов для выявления полиморфизмов в генах «SNP-экспресс-кардиогенетика» (НПФ «Литех», Россия). Определяли полиморфизмы rs6065 гена *GP1BA*, rs1126643 гена *ITGA2* и rs5918 гена *ITGB3*, чьи мутантные гомозиготные и гетерозиготные полиморфизмы повышают риск агрегации тромбоцитов и, как следствие, увеличивают вероятность тромбообразования. Выбор полиморфизмов обусловлен их способностью участвовать в регуляции функции соответствующих ключевых элементов клеточного гомеостаза (в частности компонентов основных рецепторов тромбоцитов) и их клинической значимостью.

Агрегацию тромбоцитов оценивали на лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «АЛАТ-2» («БИОЛА», Россия). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) цельную венозную кровь центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Для получения бедной тромбоцитами плазмы (БТП) остаток центрифугировали в течение 15 мин при 4500 об./мин. Для оценки индуцированной агрегации использовали наборы индукторов агрегации ООО «Технология Стандарт» (Россия): АДФ в конечной концентрации 2,5 мкг/мл, коллаген в концентрации 2,0 мкг/мл, адреналин в концентрации 5 мкг/мл и ристомин в концентрации 7,5 мг/мл. При концентрации АДФ 2,5 мкг/мл наблюдали интенсивную двухволновую (двухфазную) агрегацию с минимальной дезагрегацией, в связи с чем для исследования была выбрана данная концентрация АДФ.

По кривой светопропускания по методу Борна регистрировали амплитуду, или степень, агрегации (%), время агрегации (мин), скорость агрегации (%/мин); за 0% принимали степень агрегации ОТП, за 100% — БТП. Дополнительно определяли параметры агрегации по кривой среднего размера агрегатов [9]. После калибровки прибора размер одиночных тромбоцитов принимали за 1 относительную единицу (отн. ед.), после добавления индуктора определяли максимальное значение среднего размера агрегатов (далее — размер агрегатов). Скорость формирования агрегатов определяли как максимальный наклон кривой среднего размера и измеряли в относительных единицах в минуту (отн. ед./мин).

Статистическую обработку проводили с использованием IBM SPSS Statistics v. 23 («SPSS: An IBM Company»; США). Характеристика выборок представлена в формате «Me (Q_{25} ; Q_{75})», где Me — медиана, Q_{25} , Q_{75} — значение нижнего и верхнего квартиля соответственно. Для проверки равновесия Харди–Вайнберга использовали программу Hardy-Weinberg carrier frequency («Focus Information Technology»; США). Для оценки распределения непрерывных переменных использовали тест Шапиро–Уилка. Проверку статистических гипотез в группах проводили с использованием непараметрических критериев Манна–Уитни с расчетом точного критерия p . Различия считали статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Общая характеристика исследуемых пациентов представлена в табл. 1. Согласно полученным данным, у больных с COVID-19-АПЛ в сочетании с СД 2 по сравнению с больными без СД 2 выше ИМТ, в плазме выше уровни СРБ, лактата, D-димера и фибриногена, снижается количество тромбоцитов.

Для установления роли генетических факторов в изменении показателей тромбоцитарного звена гемостаза у больных с COVID-19-АПЛ и с СД 2 проанализирована встречаемость полиморфизмов rs5918 гена *ITGB3*, rs1126643 гена *ITGA2* и rs6065 гена *GP1BA*. Выбор указанных полиморфизмов обусловлен их ролью в экспрессии и реализации функции рецепторов тромбоцитов, участвующих в агрегации с АДФ, коллагеном и ристоминном. С учетом результатов теста Шапиро–Уилка ($p \leq 0,05$) для исследованных переменных, дальнейший анализ проводили с использованием непараметрических методов для всех сравнений. Распределение частот генотипов генов *ITGB3*, *ITGA2*, *GP1BA* в группе контроля соответствовало ожидаемому равновесию согласно точному тесту Харди–Вайнберга ($p = 0,77$; $p = 0,18$; $p = 0,31$ соответственно), в группе пациентов с COVID-19-АПЛ ($p = 0,50$; $p = 0,87$; $p = 0,82$ соответственно) и в группе больных COVID-19-АПЛ с СД 2 ($p = 0,47$; $p = 0,82$; $p = 0,71$). Комбинация двух мутаций выявлена у пяти человек (22,7%) из группы контроля; у 13 (25%) — с

Таблица 2. Частота встречаемости генотипов при анализе полиморфизма генов *ITGB3*, *GP1BA* и *ITGA2* при COVID-19-АПЛ и СД 2

Полиморфизм	Генотипы/аллели		Частота встречаемости генотипа, n (%)		
			Группа 1 Здоровые, n = 22	Группа 2 COVID-19-АПЛ, n = 52	Группа 3 COVID-19-АПЛ + СД 2, n = 56
rs5918 гена <i>ITGB3</i>	Генотипы	0 (Т/Т)	17 (77,3)	34 (65,4)	29 (51,9) *
		I (Т/С)	4 (18,2)	15 (28,8)	16 (29,6)
		II (С/С)	1 (4,5)	3 (5,8)	11 (18,5) * #
	Аллели	Т	38 (86,4)	83 (79,8)	74 (64,8)
		С	6 (13,6)	21 (20,2) *	38 (35,2) * #
rs1126643 гена <i>ITGA2</i>	Генотипы	0 (С/С)	16 (72,7)	31 (59,6)	34 (60,7)
		I (С/Т)	4 (18,2)	13 (25,0)	13 (23,2)
		II (Т/Т)	2 (9,1)	8 (15,4) *	9 (16,1)
	Аллели	С	36 (81,8)	75 (72,2)	81 (72,3)
		Т	8 (18,2)	29 (27,8) *	31 (27,7) *
rs6065 гена <i>GP1BA</i>	Генотипы	0 (С/С)	19 (83,4)	42 (79,1)	46 (81,4)
		I (С/Т)	3 (16,6)	9 (18,8)	10 (18,6)
		II (Т/Т)	0	1 (2,1)	0
	Аллели	С	40 (90,9)	93 (89,4)	102 (91,1)
		Т	4 (9,1)	11 (10,6)	10 (8,9)

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с группой 1; # — с группой 2; 0 — дикий генотип; I — гетерозигота; II — мутантная гомозигота.

COVID-19-АПЛ без СД 2; у шести человек (10,7 %) с COVID-19-АПЛ и СД 2. Комбинация трех мутаций одновременно выявлена у одного больного (4,4 %) из группы контроля; у четырех больных (7,7 %) из группы COVID-19-АПЛ без СД 2; у трех пациентов (5,4 %) с COVID-19-АПЛ и СД 2.

Ген *ITGB3* регулирует синтез мембранного белка интегрин β -3, компонента гликопротеина IIb/IIIa, участвующего во взаимодействии между тромбоцитами. Полиморфизм rs5918 гена *ITGB3* вызван заменой нуклеотида тимина (Т) на цитозин (С) в определенном участке ДНК, из-за чего происходит замена аминокислоты лейцин на пролин в 33-м положении белковой цепи и возникает нарушение трехмерной структуры рецептора [10]. Нарушение структуры рецептора в свою очередь приводит к повышению реактивности тромбоцитов и способствует усилению их агрегации [11]. У лиц с вариантом С/С этого полиморфизма повышается склонность к агрегации тромбоцитов и, соответственно, риск тромбообразования [10]. В группе пациентов с COVID-19-АПЛ без СД 2 в гене *ITGB3* по сравнению с контролем не обнаружено значимых отличий во встречаемости генотипов Т/Т, Т/С, С/С ($p > 0,05$), чаще встречается аллель С полиморфизма rs5918 гена *ITGB3* ($p = 0,045$) (табл. 2). У пациентов с COVID-19-АПЛ и СД 2 по сравнению с контролем реже встречается генотип Т/Т рассматриваемого полиморфизма, не меняется частота варианта Т/С ($p > 0,05$), чаще встречается С/С ($p = 0,03$) и в 1,82 раза чаще встречается аллель С ($p = 0,049$). У пациентов с COVID-19-АПЛ и СД 2 по сравнению с больными COVID-19-АПЛ без СД 2 не меняется частота встречаемости генотипов Т/Т и Т/С рассматриваемого полиморфизма, в 3,86 раза чаще встречается вариант С/С ($p = 0,01$), в 2,43 раза чаще — аллель С ($p = 0,04$).

Ген *ITGA2* кодирует белок интегрин альфа-2 — мембранный гликопротеин GPIa, находящийся на мембранах различных клеток, в том числе на тромбоцитах. На мембране тромбоцитов GPIa образует комплекс с GPIIb, являющимся одним из рецепторов коллагена. Полиморфизм rs1126643 гена *ITGA2* обусловлен заменой

нуклеотида цитозина (С) на тимин (Т) [12]. Эта мутация не изменяет аминокислотную последовательность, но обуславливает корреляцию между данным полиморфизмом и уровнем экспрессии GPIa на мембране тромбоцитов. В случае варианта Т/Т полиморфизма rs1126643 связь тромбоцитов с коллагеном происходит быстрее, гетерозиготные индивидуумы с вариантом С/Т демонстрируют промежуточный уровень экспрессии рецепторов [13].

В группе больных COVID-19-АПЛ без СД 2 при сравнении с контролем нет различий в частоте встречаемости генотипов С/С, С/Т и Т/Т ($p > 0,05$); в 1,82 раза чаще встречается аллель Т полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* ($p = 0,007$). У больных COVID-19-АПЛ с СД 2 при сравнении с контролем нет различий в частоте встречаемости генотипов С/С, С/Т, Т/Т ($p > 0,05$); чаще встречается аллель Т полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* ($p = 0,03$). У больных COVID-19-АПЛ с СД 2 при сравнении с больными COVID-19-АПЛ без СД 2 нет различий в частоте встречаемости генотипов С/С, С/Т, Т/Т и аллеля Т ($p > 0,05$).

Ген *GP1BA* кодирует α -субъединицу гликопротеина Ib, участвующую в образовании тромбоцитарного рецептора GpIb/IX/V. Основным лигандом рецептора является vWF, связывающий тромбоциты с участком поврежденного сосуда [14]. Сила образующейся между ними связи во многом зависит от конфигурации рецептора, структуры vWF и скорости потока крови. Полиморфизм rs6065 гена *GP1BA* связан с заменой цитозина (С) на тимин (Т) вблизи старта транскрипции гена, что приводит к замене треонина на метионин в участке рецептора, отвечающем за связывание с vWF, в результате чего у носителей генотипа Т/Т концентрация гликопротеина Ib на мембране тромбоцитов выше, чем у лиц с другими вариантами генотипа. При мутантной гомозиготной форме Т/Т (частота в популяции около 1,5%) резко повышаются риски тромбообразования [15]. При гетерозиготном варианте С/Т экспрессия рецепторов GpIb/IX/V на тромбоцитах не так сильно выражена, однако в некоторых исследованиях выявлен повышенный риск тромбообразования у носителей этого варианта гена [16].

Таблица 3. Характеристика больных с COVID-19-АПЛ и СД 2 по встречаемости полиморфизмов генов *ITGB3*, *GP1BA* и *ITGA2*

Полиморфизм	Генотипы/ аллели	COVID-19-АПЛ относительно контроля		COVID-19-АПЛ + СД 2 относительно контроля		COVID-19-АПЛ + СД 2 относительно COVID-19-АПЛ	
		χ^2 (p)	ОШ (95% ДИ)	χ^2 (p)	ОШ (95 % ДИ)	χ^2 (p)	ОШ (95 % ДИ)
rs5918 гена <i>ITGB3</i>	I (Т/С)	0,99 (0,32)	1,86 (0,54–6,53)	1,85 (0,181)	2,34 (0,67–8,17)	1,19 (0,28)	1,25 (0,68–2,31)
	II (С/С)	0,12 (0,73)	1,50 (0,16–15,52)	1,53 (0,25)	1,80 (0,43–7,51)	6,55 (0,011) *	3,89 (1,07–14,12) *
	С	3,86 (0,045) *	1,61 (1,32–4,29)	7,60 (0,02) *	1,82 (1,15–2,86) *	9,35 (0,002) *	2,43 (1,54–3,83) *
rs6065 гена <i>GP1BA</i>	I (С/Т)	1,465 (0,226)	1,36 (0,33–5,58)	1,77 (0,18)	0,65 (0,21–2,08)	0,04 (0,84)	1,02 (0,38–2,74)
	II (Т/Т)	–	–	–	–	–	–
	Т	0,12 (0,73)	0,83 (0,47–3,90)	0,75 (0,39)	0,69 (0,37–1,28)	0,16 (0,69)	0,83 (0,44–1,58)
rs1126643 гена <i>ITGA2</i>	I (С/Т)	0,1 (0,093)	0,96 (0,32–2,77)	0,16 (0,69)	1,15 (0,38–3,50)	0,08 (0,78)	0,91 (0,47–1,77)
	II (Т/Т)	3,68 (0,060)	2,11 (0,98–4,61)	0,40 (0,80)	1,07 (0,23–4,91)	0,12 (0,73)	1,08 (0,44–2,69)
	Т	1,33 (0,04) *	1,71 (1,23–3,90) *	1,78 (0,013) *	1,84 (1,11–3,26) *	0,42 (0,52)	0,24 (0,11–0,52)

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия; I — гетерозигота; II — мутантная гомозигота.

В результате исследования у больных COVID-19-АПЛ по сравнению с контролем не выявлено различий в частоте встречаемости рассматриваемых генотипов полиморфизма rs6065 гена *GP1BA* ($p > 0,05$); нет различий в частоте генотипов у больных COVID-19-АПЛ и с СД 2 как с группой контроля, так и с группой COVID-19-АПЛ без СД 2.

Проведена оценка частоты встречаемости рассматриваемых полиморфизмов по критерию Пирсона с расчетом ОШ (табл. 3).

У больных COVID-19-АПЛ относительно группы контроля в 1,71 раза чаще встречается аллель Т полиморфизма rs1126643 в гене *ITGA2* (95 % ДИ: 1,23–3,90); у больных COVID-19-АПЛ и с СД 2 в 1,82 раза (95 % ДИ: 1,15–2,86) и 1,84 раза (95 % ДИ: 1,11–3,26) чаще встречаются мутантные аллели С и Т полиморфизмов rs5918 гена *ITGB3* и rs1126643 гена *ITGA2* соответственно. У больных COVID-19-АПЛ и СД 2 относительно больных без СД 2 в 3,89 раза (95 % ДИ: 1,07–14,12) и 2,43 раза

Таблица 4. Показатели индуцированной агрегации тромбоцитов при COVID-19-АПЛ и СД 2 в зависимости от полиморфизмов генов *ITGB3*, *ITGA2* и *GP1BA* на 7-е сутки, Me (Q_{25} ; Q_{75})

Полиморфизм	Генотипы	Группа 2 COVID-19-АПЛ, $n = 52$	Группа 3 COVID-19-АПЛ + СД 2, $n = 56$
rs5918 гена <i>ITGB3</i>	Скорость АДФ-индуцированной агрегации, %/мин		
	0 (Т/Т)	7,70 (5,07; 9,44)	8,53 (7,89; 12,35)
	I (Т/С)	8,98 (5,78; 13,81)	11,44 (9,61; 15,24) *
	II (С/С)	8,28 (6,51; 9,57)	16,53 (7,89; 18,35) * #
	Скорость формирования агрегатов, АДФ-индуцированная агрегация, отн. ед./мин		
	0 (Т/Т)	17,22 (12,38; 22,11)	20,19 (17,11; 23,17)
	I (Т/С)	17,38 (11,26; 24,75)	23,19 (17,31; 25,72) *
	II (С/С)	18,04 (13,26; 21,82)	24,74 (16,91; 28,12) *
rs1126643 гена <i>ITGA2</i>	Скорость коллаген-индуцированной агрегации, %/мин		
	0 (С/С)	7,80 (6,97; 10,01)	9,39 (7,78; 11,55)
	I (С/Т)	12,09 (10,37; 18,22) *	11,11 (9,51; 13,05)
	II (Т/Т)	11,59 (10,24; 13,39) *	12,24 (10,98; 14,45) *
	Скорость формирования агрегатов, коллаген-индуцированная агрегация, отн. ед./мин		
	0 (С/С)	13,17 (7,31; 19,63)	17,17 (12,60; 24,11)
	I (С/Т)	14,02 (8,67; 24,15)	18,24 (13,41; 22,58)
	II (Т/Т)	17,25 (9,42; 22,14) * #	16,22 (13,01; 19,28)
rs6065 гена <i>GP1BA</i>	Скорость ристомин-индуцированной агрегации, %/мин		
	0 (С/С)	8,34 (5,02; 10,24)	9,34 (4,54; 12,06)
	I (С/Т)	10,41 (8,67; 12,34)	10,32 (7,66; 14,43)
	II (Т/Т)	7,92	–
	Скорость формирования агрегатов, ристомин-индуцированная агрегация, отн. ед./мин		
	0 (С/С)	12,72 (6,17; 19,03)	21,59 (11,24; 25,74)
	I (С/Т)	13,06 (8,44; 17,28)	22,44 (12,78; 26,67)
	II (Т/Т)	13,68	–

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия с гомозиготным немутантным вариантом внутри группы по критериям Краскела–Уоллиса с тестом Данна; # — с гетерозиготным вариантом внутри группы; 0 — дикий генотип; I — гетерозигота; II — мутантная гомозигота.

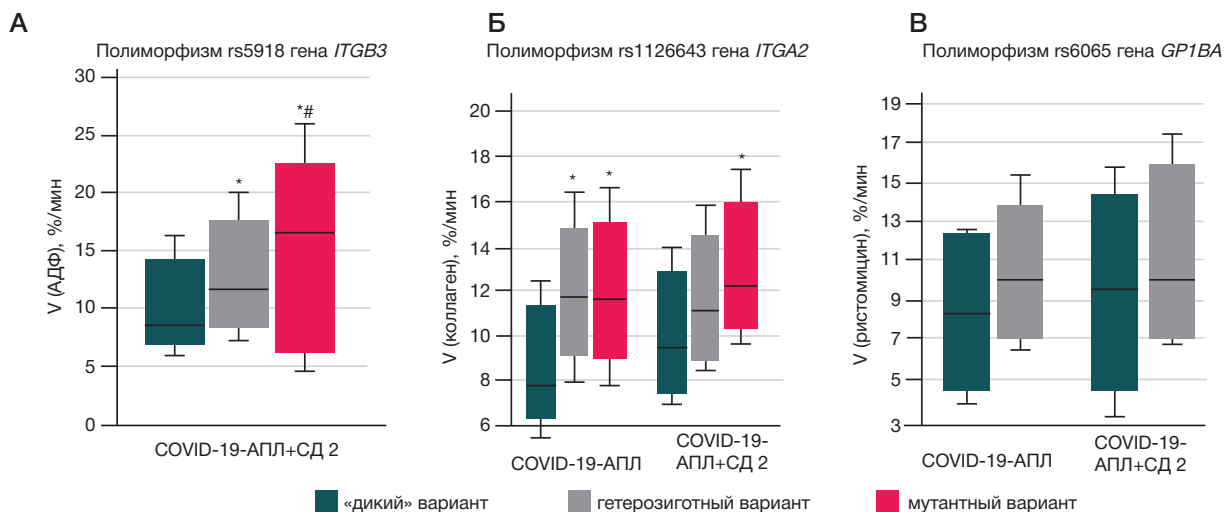


Рис. Показатели гемостаза у больных COVID-19-АПЛ и с СД 2 носителей мутантных полиморфизмов генов факторов гемостаза: rs5918 гена *ITGB3* (**А**); rs1126643 гена *ITGA2* (**Б**); rs6065 гена *GP1BA* (**В**). V (индуктор) — скорость индуцированной агрегации тромбоцитов; * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) с носителями «дикого» генотипа; # — с носителями гетерозиготы

(95% ДИ: 1,54–3,83) чаще встречаются вариант C/C и аллель C полиморфизма rs5918 гена *ITGB3*.

Для установления роли генетических факторов в изменении показателей клеточного звена гемостаза у больных с COVID-19-АПЛ и с СД 2 проанализирована скорость индуцированной АДФ, коллагеном и ристомиином агрегации тромбоцитов при вариантах полиморфизмов rs5918 гена *ITGB3*, rs1126643 гена *ITGA2* и rs6065 гена *GP1BA* (табл. 4, рис.).

В результате анализа агрегации тромбоцитов у больных COVID-19-АПЛ без СД 2 полиморфизм rs5918 гена *ITGB3* не оказывает влияния на скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов; при COVID-19-АПЛ с СД 2 у носителей T/C варианта скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов выше на 34% по сравнению с носителями T/T варианта; у носителей C/C — выше на 92% по сравнению с T/T и на 44% — по сравнению с T/C. Скорость формирования агрегатов при индукции АДФ у больных с COVID-19-АПЛ без СД 2 не меняется в зависимости от наличия мутантного аллеля; у больных с СД 2-го типа — выше у носителей T/C и C/C вариантов по сравнению с T/T вариантом на 14 и 23% по медиане соответственно.

Для установления роли полиморфизма rs5918 гена *ITGB3* в изменении скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных с COVID-19-АПЛ и с СД 2 использован метод Краскела–Уоллиса с тестом Данна; установлено, что наличие мутантного аллеля объясняет значительную долю общей вариабельности скорости АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных COVID-19-АПЛ при наличии СД 2 ($p = 0,0045$). Возможным объяснением полученных данных может служить увеличение среднего объема тромбоцита у носителей повышенного количества гликопротеина IIb/IIIa на мембране тромбоцитов и, как следствие, их повышенная реактивность. Однако точные механизмы, вызывающие агрегацию тромбоцитов при наличии варианта C/C полиморфизма rs5918, до конца не ясны и требуют дальнейшего исследования.

В ходе анализа агрегации тромбоцитов в группе больных COVID-19-АПЛ без СД 2 в зависимости от полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* отмечено, что при вариантах C/T и T/T по сравнению с C/C ускоряется коллаген-индуцированная агрегация тромбоцитов — на 55

и 49% соответственно ($p = 0,003$, $p = 0,005$); при COVID-19-АПЛ с СД 2 у носителей T/T варианта скорость коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов выше на 30% по сравнению с носителями C/C варианта ($p = 0,014$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тромбоциты пациентов с СД 2 демонстрируют более сильный ответ на агонисты и более заметную мембранную экспрессию адгезивных молекул, таких как тромбоспондин, Р-селектин, GPIIb-IIIa, GPVI и CD40L [17]. Гипергликемия, связанная с СД 2, влияет на экспрессию ключевых рецепторов и активность ферментов тромбоцитов: уровень экспрессии рецепторов простаглицина снижен при СД 2, что усиливает агрегацию тромбоцитов; повышена активность рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), что делает тромбоциты этих пациентов более чувствительными к IGF1, который является регулятором передачи сигналов и ответов тромбоцитов и вызывает их гиперактивность [18]. При СД 2 на тромбоцитах повышается экспрессия интегрин β_3 , компонента гликопротеина IIb/IIIa, обеспечивающего агрегацию тромбоцитов, что приводит к их повышенной активации и объясняет полученные показатели агрегации тромбоцитов [19].

Полученные в ходе исследования данные — ускорение индуцированной коллагеном агрегации тромбоцитов — соответствуют известным сведениям о функции интегрин альфа-2 и могут указывать на роль полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* в патогенезе COVID-19, хотя его механизм остается не до конца ясным. Наблюдаемые результаты демонстрируют меньшее влияние полиморфизма на скорость коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных с СД 2, что может быть объяснено преобладанием других активаторов тромбоцита в этой группе: окислительным стрессом или хроническим воспалением.

В представленном исследовании не получено данных, указывающих на влияние полиморфизма rs6065 гена *GP1BA* на ускорение ристомиин-индуцированной агрегации тромбоцитов, отражающей взаимодействие vWF с рецептором GPIb. Возможное объяснение — отсутствие в исследуемой популяции значительного количества носителей гомозиготного мутантного варианта

гена T/T. Кроме того, в связывании vWF с GpIb тромбоцитов имеет место эффект кооперативности: в формировании комплекса с коллагеном участвуют гликопротеины IX и V, чья структура и функция могут оставаться интактными [20]. Кроме этого, в большей степени рецептор GpIb/IX/V служит для адгезии тромбоцитов, его роль в агрегации выражена в меньшей степени [21]. Таким образом, полиморфизм rs6065 гена *GP1BA* не является ведущим фактором в ускорении ристомин-индуцированной агрегации тромбоцитов у больных с COVID-19-АПЛ, полученный результат можно объяснить преобладающим действием других активаторов тромбоцитов: окислительным стрессом или гиперэргическим воспалением.

Полученные данные указывают на вероятную роль генетической предрасположенности, в частности полиморфизмов rs5918 гена *ITGB3* и rs1126643 гена *ITGA2*, в гиперактивации тромбоцитов у больных с COVID-19-АПЛ из-за усиления связи рецепторов IIb/IIIa с АДФ и увеличением уровня экспрессии рецепторов к коллагену GPIa/IIa [22].

Различия в показателях гемостаза у пациентов с COVID-19-АПЛ и в сочетании с СД 2 являются предметом научных дискуссий, одним из ключевых вопросов является противоречивость данных относительно вклада генетических факторов. С одной стороны, современные исследования указывают на то, что полиморфизмы генов, участвующих в регуляции гемостаза, могут определять индивидуальную предрасположенность к тромбообразованию, которая активируется на фоне метаболических нарушений при СД 2; с другой стороны, существует убедительная доказательная база, подтверждающая, что выраженность воспалительного ответа и тяжесть течения COVID-19 настолько доминируют в патофизиологическом процессе, что полностью маскируют любые генетические различия, делая показатели гемостаза лишь отражением острого системного повреждения, а не конституциональных особенностей пациента [7, 17–19].

Несмотря на проведение исследования на фоне применения лекарственных препаратов, изменяющих

агрегацию, можно предположить, что влияние терапевтических доз низкомолекулярного гепарина и коротких курсов глюкокортикоидов на показатели агрегации было минимальным, что согласуется с результатами проведенных ранее исследований [23, 24].

Ограничения исследования

К ограничениям представленного исследования относится небольшая выборка наблюдений, что ограничивает использование поправок на множественные сравнения, генетических моделей наследования и других статистических методов, в частности метода логистической регрессии, а также усложняет интерпретацию теста Харди-Вайнберга. Кроме того, помимо генетических факторов на функцию тромбоцитов COVID-19-АПЛ влияют особенности иммунного ответа и редокс-статуса пациентов, что также необходимо принимать во внимание при интерпретации результатов.

Выводы

При COVID-19-АПЛ мутантный аллель Т полиморфизма rs1126643 гена *ITGA2* в 1,71 раза чаще встречается у больных без СД 2 и в 1,84 раза — при наличии СД 2, у его носителей увеличивается скорость коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов (на 30–55%, $p < 0,05$); при COVID-19-АПЛ и СД 2 в 3,89 раза чаще встречается мутантный вариант С/С и в 2,43 раза — аллель С полиморфизма rs5918 гена *ITGB3*, у их носителей ускоряется АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов (на 14–23%, $p < 0,05$). Полученные результаты являются предпосылкой для дальнейших исследований по изучению патогенеза изменений гемостаза, разработке персонализированных подходов диагностики, терапии и профилактики тромболических осложнений при COVID-19-АПЛ в условиях СД 2 и других коморбидных состояний, в том числе роли эпигенетических факторов и мультиколлинеарности исследованных полиморфизмов в формировании гиперреактивности тромбоцитов как одного из ведущих звеньев патогенеза.

Литература

1. Degenhardt F, Ellinghaus D, Juzenas J, et al. Detailed stratified GWAS analysis for severe COVID-19 in four European populations. *Human Molecular Genetics*. 2022; 31 (23): 3945–66.
2. Koyou HL, Salleh MN, Jelemie CS, et al. TMPRSS2: A Key Host Factor in SARS-CoV-2 Infection and Potential Therapeutic Target. *Medical Management Journal*. 2025; 26 (4): 101–9.
3. Janssen R, Walk J. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) gene polymorphism as determinant of differences in Covid-19-related disease severity. *Medical Hypotheses*. 2020; 144. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987720324713?via%3Dihub> (дата обращения: 23.04.2026).
4. Ponti G, Pastorino L, Manfredini M, et al. COVID-19 spreading across world correlates with C677T allele of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene prevalence. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021; 35 (7). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.23798> (дата обращения: 23.04.2026).
5. Ryu T, Adler BL, Jeong SJ, et al. Quantitative serum proteomic analysis for biomarker discovery in post-COVID-19 postural orthostatic tachycardia syndrome (PC-POTS) patients. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2025; 258. Available from: [https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702\(25\)00009-8/fulltext](https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702(25)00009-8/fulltext) (дата обращения: 23.04.2026).
6. Feng S, Song F, Guo W, et al. Potential Genes Associated with COVID-19 and Comorbidity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 19 (2): 402–15.
7. Lima-Martínez MM, Carrera Boada C, Madera-Silva MD, et al. COVID-19 and diabetes: A bidirectional relations. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2021; 33 (3): 151–7.
8. Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 18 (26.10.2023). КонтурНорматив. Available from: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=458540&ysclid=mieheo3zin907543662> (дата обращения: 22.04.2026).
9. Габбасов З. А., Попов Б. Г., Гаврилов И. Ю., и др. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов. *Лабораторное дело*. 1989; 10: 15–18.
10. Khatami M, Heidari MM, Soheilyfar S. Common rs5918 (PIA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease. *Archives of Medical Sciences. Atherosclerotic Diseases*. 2016; 1 (1): e9–e15.

11. Alsulaim AY, Azam F, Sebastian T, et al. The association between two genetic polymorphisms in ITGB3 and increase risk of venous thromboembolism in cancer patients in Eastern Province of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022; 29 (1): 183–9.
12. Yuan J, Jiang Z, Li M, et al. Integrin $\alpha 2$ gene polymorphism is a risk factor of coronary artery lesions in Chinese children with Kawasaki disease. *Pediatric Rheumatology Online Journal*. 2021; 19 (1). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12969-021-00494-5> (дата обращения: 23.04.2026).
13. Aloui C, Prigent A, Tariket S, et al. Levels of human platelet-derived soluble CD40 ligand depend on haplotypes of CD40LG-CD40-ITGA2. *Scientific Reports*. 2016; 6. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep24715> (дата обращения: 23.04.2026).
14. Dib F, Quémener A, Bayart S, et al. Biological, clinical features and modelling of heterozygous variants of glycoprotein Ib platelet subunit alpha (GP1BA) and glycoprotein Ib platelet subunit beta (GP1BB) genes responsible for constitutional thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*. 2022; 199 (5): 744–53.
15. Ko EJ, Ahn EH, Park HW, et al. Genetic Associations of ITGB3, FGG, GP1BA, PECAM1, and PEAR1 Polymorphisms and the Platelet Activation Pathway with Recurrent Pregnancy Loss in the Korean Population. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26 (15). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/15/7505> (дата обращения: 23.04.2026).
16. Castaman G, Federici AB. Type 2B von Willebrand Disease: A Matter of Plasma Plus Platelet Abnormality. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2016; 42 (5): 478–82.
17. Fields AT, Andraska EA, Kaltenmeier C, et al. Effects of the circulating environment of COVID-19 on platelet and neutrophil behavior. *Frontiers in Immunology*. 2023; 14 Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1130288/full> (дата обращения: 23.04.2026).
18. Henein MY, Vancheri S, Longo G, et al. The Role of Inflammation in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23 (21). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/12906> (дата обращения: 23.04.2026).
19. Timóteo AT. Is There a Second Wind for Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors in Elderly Diabetic Females with ST-Elevation Myocardial Infarction, or are We on Thin Ice? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2021; 116 (2): 236–37.
20. Seth R, McKinnon TAJ, Zhang XF. Contribution of the von Willebrand factor/ADAMTS13 imbalance to COVID-19 coagulopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2022; 322 (1): H87–H93.
21. Li, R. Recent advances on GPIIb-IX-V complex. *Platelets*. 2022; 33 (6): 809–10.
22. Осиков М. В., Антонов В. Н., Зотов С. О. Роль полиморфизма генов ITGB3, GP1B1 и ITGA2 в патогенезе гиперреактивности тромбоцитов при COVID-19-ассоциированном поражении легких средней и тяжелой степени тяжести. *Acta Biomedica Scientifica*. 2023; 8 (6): 14–22.
23. Buryachkovskaya L, Lomakin N, et al. Enoxaparin dose impacts blood cell phenotypes during mild SARS-CoV-2 infection: the observational single-center study. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2021; 22 (4). Available from: <https://www.imrpress.com/journal/RCM/22/4/10.31083/j.rcm2204176> (дата обращения: 31.05.2026).
24. Adiguzel C, Iqbal O. Comparative anticoagulant and platelet modulatory effects of enoxaparin and sulodexide. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009; 15 (5): 501–11.

References

1. Degenhardt F, Ellinghaus D, Juzenas J, et al. Detailed stratified GWAS analysis for severe COVID-19 in four European populations. *Human Molecular Genetics*. 2022; 31 (23): 3945–66.
2. Koyou HL, Salleh MN, Jelemeie CS, et al. TMPRSS2: A Key Host Factor in SARS-CoV-2 Infection and Potential Therapeutic Target. *Medical Management Journal*. 2025; 26 (4): 101–9.
3. Janssen R, Walk J. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) gene polymorphism as determinant of differences in Covid-19-related disease severity. *Medical Hypotheses*. 2020; 144. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987720324713?via%3Dihub> (дата обращения: 23.04.2026).
4. Ponti G, Pastorino L, Manfredini M, et al. COVID-19 spreading across world correlates with C677T allele of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene prevalence. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021; 35 (7). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.23798> (дата обращения: 23.04.2026).
5. Ryu T, Adler BL, Jeong SJ, et al. Quantitative serum proteomic analysis for biomarker discovery in post-COVID-19 postural orthostatic tachycardia syndrome (PC-POTS) patients. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2025; 258. Available from: [https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702\(25\)00009-8/fulltext](https://www.autonomicneuroscience.com/article/S1566-0702(25)00009-8/fulltext) (дата обращения: 23.04.2026).
6. Feng S, Song F, Guo W, et al. Potential Genes Associated with COVID-19 and Comorbidity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 19 (2): 402–15.
7. Lima-Martínez MM, Carrera Boada C, Madera-Silva MD, et al. COVID-19 and diabetes: A bidirectional relations. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2021; 33 (3): 151–7.
8. Vremennye metodicheskie rekomendacii Ministerstva zdravoohraneniya Rossijskoj Federacii «Profilaktika, diagnostika i lechenie novoj koronavirusnoj infekcii (COVID-19)», versiya 18 (26.10.2023). *KonturNormativ*. Available from: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=1&documentId=458540&ysclid=m1e903zin907543662> (дата обращения: 22.04.2026). Russian.
9. Gabbasov ZA, Popov BG, Gavrilo IYu, i dr. Novyj vysokochuvstvitel'nyj metod analiza agregacii trombocitov. *Laboratornoe delo*. 1989; 10: 15–18. Russian.
10. Khatami M, Heidari MM, Soheliyar S. Common rs5918 (PIA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease. *Archives of Medical Sciences. Atherosclerotic Diseases*. 2016; 1 (1): e9–e15.
11. Alsulaim AY, Azam F, Sebastian T, et al. The association between two genetic polymorphisms in ITGB3 and increase risk of venous thromboembolism in cancer patients in Eastern Province of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2022; 29 (1): 183–9.
12. Yuan J, Jiang Z, Li M, et al. Integrin $\alpha 2$ gene polymorphism is a risk factor of coronary artery lesions in Chinese children with Kawasaki disease. *Pediatric Rheumatology Online Journal*. 2021; 19 (1). Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12969-021-00494-5> (дата обращения: 23.04.2026).
13. Aloui C, Prigent A, Tariket S, et al. Levels of human platelet-derived soluble CD40 ligand depend on haplotypes of CD40LG-CD40-ITGA2. *Scientific Reports*. 2016; 6. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep24715> (дата обращения: 23.04.2026).
14. Dib F, Quémener A, Bayart S, et al. Biological, clinical features and modelling of heterozygous variants of glycoprotein Ib platelet subunit alpha (GP1BA) and glycoprotein Ib platelet subunit beta (GP1BB) genes responsible for constitutional thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*. 2022; 199 (5): 744–53.
15. Ko EJ, Ahn EH, Park HW, et al. Genetic Associations of ITGB3, FGG, GP1BA, PECAM1, and PEAR1 Polymorphisms and the Platelet Activation Pathway with Recurrent Pregnancy Loss in the Korean Population. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025; 26 (15). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/26/15/7505> (дата обращения: 23.04.2026).
16. Castaman G, Federici AB. Type 2B von Willebrand Disease: A Matter of Plasma Plus Platelet Abnormality. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2016; 42 (5): 478–82.
17. Fields AT, Andraska EA, Kaltenmeier C, et al. Effects of the circulating environment of COVID-19 on platelet and neutrophil behavior. *Frontiers in Immunology*. 2023; 14 Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1130288/full> (дата обращения: 23.04.2026).

- fimmu.2023.1130288/full (data obrashcheniya: 23.04.2026).
18. Henein MY, Vancheri S, Longo G, et al. The Role of Inflammation in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23 (21). Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/12906> (data obrashcheniya: 23.04.2026).
19. Timóteo AT. Is There a Second Wind for Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors in Elderly Diabetic Females with ST-Elevation Myocardial Infarction, or are We on Thin Ice? *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2021; 116 (2): 236–37.
20. Seth R, McKinnon TAJ, Zhang XF. Contribution of the von Willebrand factor/ADAMTS13 imbalance to COVID-19 coagulopathy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2022; 322 (1): H87–H93.
21. Li, R. Recent advances on GPIIb-IX-V complex. *Platelets*. 2022; 33 (6): 809–10.
22. Osikov MV, Antonov VN, Zotov SO. Rol' polimorfizma genov ITGB3, GP1B1 i ITGA2 v patogeneze giperreaktivnosti trombocitov pri COVID-19-associrovannom porazhenii legkih srednej i tyazhelej stepeni tyazhesti. *Acta Biomedica Scientifica*. 2023; 8 (6): 14–22. Russian.
23. Buryachkovskaya L, Lomakin N, et al. Enoxaparin dose impacts blood cell phenotypes during mild SARS-CoV-2 infection: the observational single-center study. *Reviews in Cardiovascular Medicine*. 2021; 22 (4). Available from: <https://www.imrpress.com/journal/RCM/22/4/10.31083/j.rcm2204176> (data obrashcheniya: 31.05.2026).
24. Adiguzel C, Iqbal O. Comparative anticoagulant and platelet modulatory effects of enoxaparin and sulodexide. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009; 15 (5): 501–11.

ИНТЕГРИРОВАННАЯ РЕФЕРЕНСНАЯ ПАНЕЛЬ ГАПЛОТИПОВ *MACACA MULATTA* ДЛЯ ИМПУТАЦИИ ГЕНОТИПОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ СМЕШАННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Ф. С. Шарко, А. В. Прокопенко, А. О. Изотова, С. В. Тошчаков ✉

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

Импутация генотипов позволяет значительно снизить затраты на получение полногеномных данных при сохранении информативности, однако ее точность напрямую зависит от наличия качественной фазированной референсной панели гаплотипов. Существующие панели для *Macaca mulatta* охватывают преимущественно индийскую линию вида и не отражают генетическую структуру лабораторных популяций смешанного происхождения. Целью ретроспективного биоинформатического исследования было создать и отвалидировать фазированную референсную панель на основе консолидации 618 общедоступных полногеномных данных *M. mulatta* обеих географических линий, обработанных по единому стандартизированному протоколу. Итоговая панель включает 33 457 491 SNP-маркер. Валидация на образцах индийского и китайского происхождения при сверхнизком покрытии (0,1x–0,9x) подтвердила высокую точность импутации, максимальную для доминирующей в панели индийской линии. Апробация на 10 независимых образцах при покрытии 0,6x показала высокий средний показатель достоверности импутации (INFO = 0,898). Созданный ресурс открывает возможности для экономически эффективного генотипирования больших когорт *M. mulatta* и служит основой для проведения полногеномных ассоциативных и популяционно-генетических исследований в отечественных и зарубежных приматологических центрах.

Ключевые слова: импутация генотипов, референсная панель, *Macaca mulatta*, полногеномное секвенирование, GLIMPSE2, SHAPEIT5, биоинформатика

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2030 г.), соглашение №075-15-2025-491 от 30.05.2025.

Благодарности: работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования «Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса» НИЦ «Курчатовский институт», <http://ckp.nrcki.ru/>.

Вклад авторов: С. В. Тошчаков — дизайн работы, написание рукописи; Ф. С. Шарко — биоинформатический анализ, подготовка черновика; А. В. Прокопенко, А. О. Изотова — редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследования одобрены этическим комитетом НИЦ «Курчатовский институт» (протокол №2-2пр от 30 июня 2025 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Степан Владимирович Тошчаков
пл. Академика Курчатова, д. 1, г. Москва, 123098, Россия; stepan.toshchakov@gmail.com

Статья получена: 14.07.2026 **Статья принята к печати:** 14.08.2026 **Опубликована онлайн:** 21.08.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.045

Авторские права: © 2026 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/>).

INTEGRATED REFERENCE PANEL OF *MACACA MULATTA* HAPLOTYPES FOR GENOTYPE IMPUTATION IN POPULATIONS OF MIXED ORIGIN

Sharko FS, Prokopenko AV, Izotova AO, Toshchakov SV ✉

National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

Genotype imputation makes it possible to considerably reduce the cost of whole-genome data acquisition preserving the information value, but its accuracy depends directly on the availability of a high-quality phased reference panel of haplotypes. The existing panels for *Macaca mulatta* cover mostly the Indian species lineage and do not reflect the genetic structure of laboratory populations of mixed origin. This retrospective bioinformatics study aimed to produce and validate a phased reference panel based on the consolidation of publicly available whole-genome datasets from 618 *M. mulatta* individuals of both geographic lineages processed in accordance with the common standardized protocol. The resulting panel includes 33,457,491 SNP markers. Validation on samples of Indian and Chinese origin with ultra-low coverage (0.1x–0.9x) confirmed high imputation accuracy, which was highest for the Indian lineage dominant in the panel. Testing on 10 independent samples with the 0.6x coverage showed a high average imputation reliability score (INFO = 0.898). The created resource opens the prospects for cost-effective genotyping of large *M. mulatta* cohorts and provides the basis for whole-genome association and population genetic studies in domestic and foreign primate research centers.

Keywords: genotype imputation, reference panel, *Macaca mulatta*, whole-genome sequencing, GLIMPSE2, SHAPEIT5, bioinformatics

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019–2030), agreement No. 075-15-2025-491 dated 30.05.2025.

Acknowledgements: the study was conducted using the equipment of the shared use center "Complex for Modeling and Processing Data from Mega-Class Research Facilities", National Research Centre "Kurchatov Institute", <http://ckp.nrcki.ru/>.

Author contribution: Toshchakov SV — research design, manuscript writing; Sharko FS — bioinformatics analysis, manuscript draft; Prokopenko AV, Izotova AO — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the studies were approved by the Ethics Committee of the National Research Centre "Kurchatov Institute" (protocol №2-2np dated June 30, 2025).

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan V. Toshchakov
Academician Kurchatov pl, 1, Moscow, 123098, Russia; stepan.toshchakov@gmail.com

Received: 14.07.2026 **Accepted:** 14.08.2026 **Published online:** 21.08.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.045

Copyright: © 2026 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/>).

Макак-резус (*Macaca mulatta*) относится к числу наиболее распространенных модельных организмов в биомедицинских исследованиях. В сфере инфекционной патологии этот вид служит моделью для изучения патологий человека различной этиологии, включая ВИЧ-инфекцию/СПИД, туберкулез, гепатиты, грипп [1]. Кроме того, благодаря высокому филогенетическому сходству нервной системы макака и человека, они активно используются в нейробиологии, в частности при моделировании нейродегенеративных процессов и болезни Альцгеймера [2], ряда редких наследственных заболеваний [3], а также при доклинической оценке нейроактивных лекарственных средств [4]. Широкое применение этого вида в экспериментальной биомедицине обуславливает значительный интерес к изучению генетических основ фенотипической изменчивости *M. mulatta*, в частности, различий в восприимчивости к заболеваниям и ответе на терапию [5].

Ключевым инструментом для решения таких задач служат полногеномные ассоциативные исследования (GWAS), однако их проведение на больших когортах ограничено высокой стоимостью полногеномного секвенирования [6]. В условиях ограниченного бюджета особую значимость приобретают подходы, позволяющие сократить затраты на получение геномных данных без потери их информативности. Эффективной альтернативой прямому глубокому секвенированию выступает секвенирование с низким покрытием с последующей статистической импутацией генотипов. Этот подход позволяет восстанавливать пропущенные генотипы на основе известных гаплотипов из эталонной (референсной) панели, в разы снижая стоимость анализа по сравнению со стандартным покрытием (от 20x) и делая возможным проведение популяционных исследований на выборках из тысяч образцов [7]. Ключевым фактором, определяющим эффективность импутации, является наличие репрезентативной, фазированной и генетически близкой к целевой выборке референсной панели [8].

Для *M. mulatta* создан ряд геномных ресурсов, ориентированных на каталогизацию и аннотацию известных генетических вариантов. Наиболее масштабным из них является mGAP, предоставляющий каталог аннотированных вариантов, полученных в результате секвенирования 2,5 тыс. особей [5]. Стоит также отметить базу данных RhesusBase, включающую 46,1 млн полиморфных сайтов [9] и ресурс для межвидовых сравнений внутри рода *Macaca* MACSNVdb (74,5 млн SNV) [10]. Эти ресурсы решают задачи каталогизации, аннотации и поиска известных вариантов, однако не предоставляют фазированной референсной панели гаплотипов, необходимой для восстановления полногеномных генотипов у новых, ранее не секвенированных образцов.

В современной практике фазированные референсные панели для импутации генотипов служат базовым инструментом в крупных геномных проектах, связанных с изучением человека и сельскохозяйственных животных [11, 12]. В международных репозиториях представлены обширные массивы данных полногеномного секвенирования *Macaca mulatta*. В 2025 г. была опубликована первая специализированная референсная панель для данного вида, обеспечивающая высокую точность импутации генотипов даже при уровне покрытия 0,5x [13]. Тем не менее этот ресурс ограничен преимущественно индийской линией *Macaca mulatta*. За рамками анализа остается генетическая

структура искусственно созданных закрытых популяций, генезис которых связан с гетерогенным происхождением исходного поголовья, фрагментарностью архивных данных об интродукции и многолетней панмиксией [14, 15]. Для таких популяций смешанного происхождения оптимальным решением становится использование интегрированной панели, объединяющей основные географические линии вида, что сочетает популяционную специфичность и универсальность.

Целью настоящей работы было описать разработку и валидацию фазированной референсной панели для импутации генотипов *M. mulatta*. Панель сформирована на основе результатов полногеномного секвенирования 618 образцов индийского и китайского происхождения из открытых источников, обработанных по единому стандартизированному протоколу с использованием современных алгоритмов фазирования и импутации. При оценке точности импутации по независимым тестовым образцам обеих линий получены высокие значения R^2 и конкордантности в диапазоне глубины покрытия 0,1x–0,9x при ожидаемом преимуществе доминирующей в панели индийской линии. Разработанный ресурс служит основой для проведения полногеномных ассоциативных и популяционно-генетических исследований на макаках-резус в отечественных и зарубежных приматологических центрах, генетическая структура популяций в которых может быть смешанной и априори неизвестной [16, 17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор и систематизация общедоступных данных полногеномного секвенирования

Систематический поиск данных полногеномного секвенирования *M. mulatta* осуществляли в международных репозиториях NCBI SRA [18], ENA [19] и NGDC [20]. Отбор данных производили на основании следующих критериев: подтвержденная видовая принадлежность к *M. mulatta*, глубина секвенирования не менее 20x, а также наличие верифицированных метаданных о географическом происхождении (Индия или Китай) и поле особи. В ходе первичного поиска было идентифицировано 1808 образцов. После фильтрации по величине покрытия и валидации метаданных число кандидатов составило 982. Из дальнейшего анализа исключали особи, определенные в метаданных как межвидовые гибриды (*M. mulatta* × *M. fascicularis*), а также образцы с неустановленным географическим происхождением.

На заключительном этапе формирования выборки применяли процедуру стратификации, направленную на достижение сбалансированного по полу состава внутри каждой популяционной группы и на минимизацию потенциальных систематических искажений, обусловленных неодинаковой представленностью данных из различных исследований. Итоговый массив включил 618 уникальных особей из трех проектов: PRJNA251548 (BCM, $n = 21$), PRJNA382404 (OHSU, $n = 397$) и CRA014717 (KIZ, $n = 200$). Из общего числа образцов 418 имели индийское происхождение, 200 — китайское; количество самок составило 410, самцов — 208. Сведения о географическом происхождении и поле каждого образца представлены в файле dataset-description.xlsx в открытом репозитории Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.21296424>.

Биоинформатическая обработка и идентификация SNP

Для всех 618 образцов был разработан и применен единый стандартизированный пайплайн биоинформатической обработки, обеспечивающий консистентность данных на всех этапах. Необработанные прочтения фильтровали по качеству с помощью fastp v0.23.2 [21] с параметрами: `-w 12 -z 7 -V -g --poly_g_min_len 5 -x --poly_x_min_len 10 -5 -3 -M 30 -n 1 -e 20 -l 50 --c`. Отфильтрованные прочтения картировались на референсный геном *M. mulatta* (сборка Mmul_10, GCF_003339765.1) с использованием Bowtie2 v2.3.5.1 [22] с настройками по умолчанию. Идентификацию SNP выполняли с помощью bcftools v1.15 [23] (команды `mpileup` и `call`) с ключевыми параметрами: `--redo-BAQ --min-BQ 30 --per-sample-mF --annotate DP,AD --multiallelic-caller --variants-only`. На следующем этапе из итоговых VCF-файлов удаляли инсерции и делеции с использованием vcftools v0.1.16 (параметр `--remove-indels`), оставляя только однонуклеотидные замены (SNP) для дальнейшего анализа. Полученный VCF-файл подвергали дополнительной строгой фильтрации с использованием vcftools v0.1.16 [24] по критериям: качество генотипа (GQ) ≥ 30 , глубина прочтения (DP) 15–180, доля пропущенных генотипов на сайт $\leq 0,02$, минимальная частота минорного аллеля (MAF) $\geq 0,01$.

Фазирование референсной панели

Для восстановления хромосомных фаз гаплотипов отфильтрованного набора данных использовали пакет SHAPEIT5 v5.1.0 [25], разработанный для крупных массивов WGS-данных и характеризующийся высокой точностью восстановления гаплотипных фаз при работе с большими выборками. Для повышения вычислительной эффективности и снижения требований к оперативной памяти применяли постадийное фазирование с разбиением генома на независимые блоки. На первом этапе с помощью модуля SHAPEIT5_phase_common обработку проводили в хромосомных блоках длиной 20 cM; для каждого блока выполняли независимое фазирование с последующей оценкой качества. С целью обеспечения целостности сборки полных хромосом и устранения артефактов, возникающих на границах блоков, осуществляли дополнительное фазирование в перекрывающихся участках на стыках (перекрытие 2 cM) с последующим объединением фаз в единую хромосомную последовательность. В результате была сформирована полностью фазированная панель, содержащая для каждой из 618 особей два гаплотипа (материнский и отцовский), что является необходимым условием для последующей импутации генотипов.

Импутация генотипов и валидация панели

Для оценки точности созданной референсной панели из ее состава были исключены два образца с известным географическим происхождением: M00016 (индийская популяция) и CRR1023808 (китайская популяция). Исходные BAM-файлы высокого покрытия для каждого из этих образцов были подвергнуты прореживанию (downsampling) до пяти уровней глубины покрытия: 0,1×, 0,3×, 0,5×, 0,7× и 0,9×, что позволяло имитировать условия секвенирования с низким покрытием.

Импутацию генотипов для смоделированных данных выполняли с использованием пайплайна GLIMPSE2 v2.0.0

[26]. Процедура включала последовательные этапы: разбиение генома на перекрывающиеся окна с помощью утилиты GLIMPSE2_chunk, подготовку референсной панели в формате GLIMPSE2 посредством GLIMPSE2_split_reference, непосредственно импутацию и фазирование через GLIMPSE2_phase, а также объединение результатов по всем окнам для восстановления полнохромосомных файлов с использованием GLIMPSE2_ligate.

Точность импутации оценивали путем сопоставления импутированных генотипов с референсными, в качестве которых использовали исходные генотипы высокой надежности тех же образцов до проведения прореживания. Для расчета применяли инструмент GLIMPSE2_concordance, вычисляющий два показателя: конкордантность (долю полностью совпавших генотипов) и R^2 (квадрат коэффициента корреляции между импутированными и референсными дозами аллелей). Данный подход позволял количественно охарактеризовать зависимость точности импутации от глубины покрытия целевого образца и степени его генетической близости к референсной панели. Референсная панель доступна в открытом репозитории Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.21296424>.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика созданной референсной панели

В результате консолидации и унифицированной обработки данных 618 особей *M. mulatta* сформирована фазированная референсная панель гаплотипов, включающая 33 457 491 высокодостоверный SNP-маркер. Популяционная структура панели определяется составом включенных проектов. Большинство образцов имеют индийское происхождение (418 особей; 67,6%), что связано с преобладанием в выборке проекта PRJNA382404 (ONHSU, $n = 397$), образцы которого относились к индийской популяции. Китайское происхождение установлено для 200 особей (32,4%; проект CRA014717, KIZ). Благодаря такому соотношению в панели обеспечена представленность обеих основных географических линий, что расширяет область ее применения на лабораторные популяции со смешанным или неустановленным происхождением. Половой состав выборки характеризуется смещением в сторону самок: 410 самок (66,3%) и 208 самцов (33,7%), что отражает структуру исходных общедоступных WGS-данных.

Оценка точности импутации

Оценку точности импутации выполняли по двум метрикам: конкордантности (доле полностью совпавших генотипов) и R^2 (квадрату коэффициента корреляции между импутированными и референсными дозами аллелей). В отличие от конкордантности, R^2 более чувствителен к ошибкам при редких вариантах, поскольку отражает корреляционную связь между дозами аллелей. Оба показателя ожидаемо демонстрировали прямую зависимость от уровня покрытия целевого образца: с увеличением глубины точность импутации закономерно возрастала. Дополнительно оценивали точность импутации в зависимости от частоты минорного аллеля (MAF) в диапазоне от 1 до 45%.

Для образца индийского происхождения M00016 значение R^2 при увеличении покрытия с 0,1× до 0,9× возрастало с

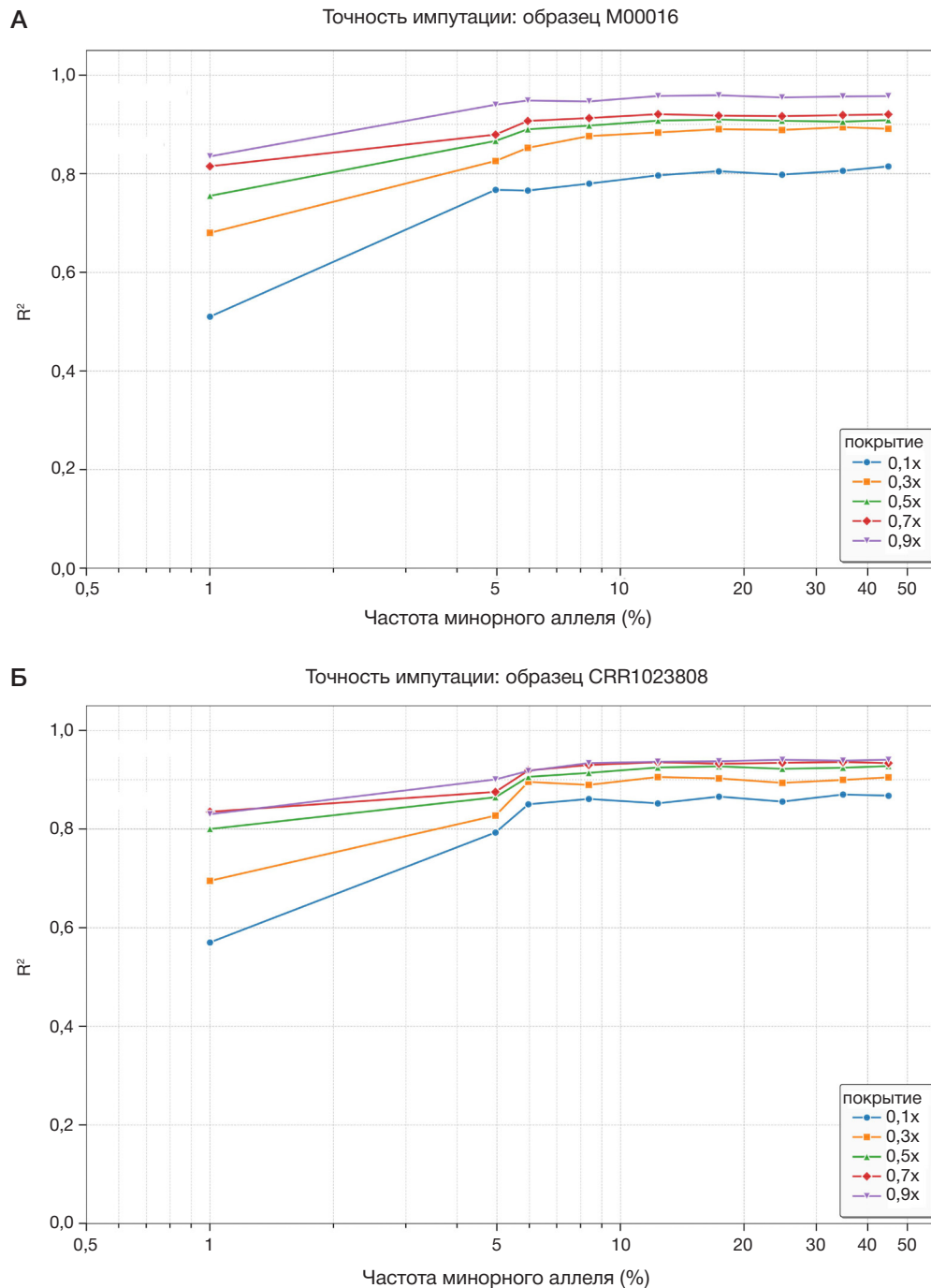


Рис. 1. Точность импутации генотипов (R^2) в зависимости от глубины покрытия и частоты минорного аллеля (MAF) для двух тестовых образцов. По оси абсцисс частота минорного аллеля (%), по оси ординат коэффициент R^2 между импутированными и референсными аллельными дозами. Каждая кривая соответствует одному из пяти уровней покрытия (0,1x; 0,3x; 0,5x; 0,7x; 0,9x). **А.** Образец индийского происхождения M00016. **Б.** Образец китайского происхождения CRR1023808

0,56 до 0,96 (рис. 1А). При стратификации по MAF установлено, что для частых вариантов ($MAF \geq 10\%$) R^2 достигал 0,95–0,96 уже при покрытии 0,7x, тогда как для редких вариантов ($MAF < 1\%$) значение R^2 составляло 0,56 при 0,1x и 0,84 при 0,9x. Конкордантность для данного образца при 0,9x варьировала от 0,61 ($MAF 1\%$) до 0,96–0,97 ($MAF \geq 10\%$).

Для образца китайской популяции CRR1023808 R^2 повышался с 0,58 при 0,1x до 0,95 при 0,9x (рис. 1Б). Для частых вариантов ($MAF \geq 10\%$) R^2 достигал 0,93–0,95 при покрытии 0,7x, для редких ($MAF 1\%$) — 0,58 при 0,1x и 0,82 при 0,9x. Конкордантность для данного образца при 0,9x составляла от 0,63 ($MAF 1\%$) до 0,95–0,97 ($MAF \geq 10\%$).

Полученные значения R^2 и конкордантности свидетельствуют о высокой эффективности созданной референсной панели для импутации генотипов у макака-резус. Для частых и среднечастотных вариантов ($MAF \geq 10\%$) значение R^2 достигает 0,93–0,96 уже при покрытии 0,7x, а конкордантность при 0,9x превышает 0,95 для обоих тестовых образцов, что подтверждает надежность восстановления генотипов для данной категории маркеров. Для редких вариантов ($MAF 1\%$) точность импутации ожидаемо ниже: R^2 составляет 0,82–0,84 при 0,9x, конкордантность — 0,86–0,88, что указывает на необходимость более глубокого покрытия (не менее 0,7x–0,9x) при проведении исследований, ориентированных

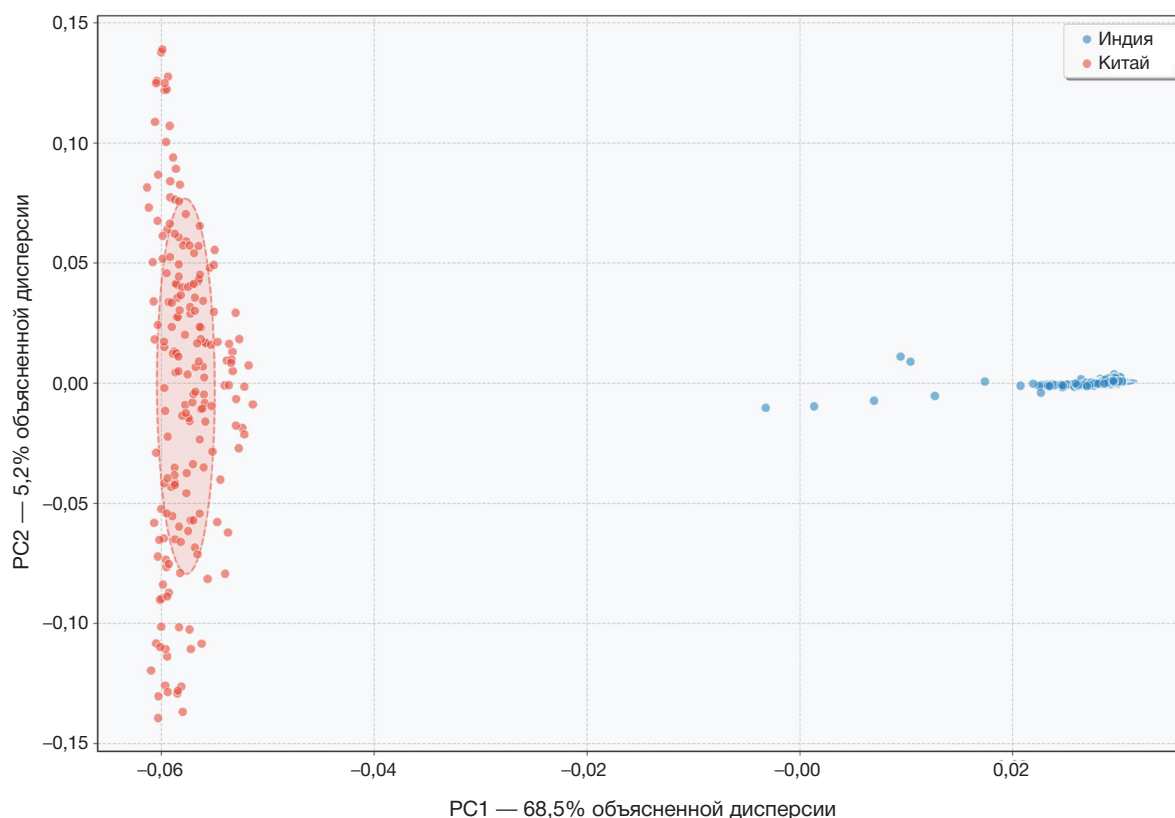


Рис. 2. Анализ главных компонент референсной панели гаплотипов *M. mulatta* ($n = 618$). Синим цветом обозначены образцы индийского происхождения ($n = 418$), красным — образцы китайского происхождения ($n = 200$)

на анализ редких генетических вариантов. Таким образом, созданная панель обеспечивает высокую точность импутации для широкого спектра вариантов и может быть использована в популяционных и ассоциативных исследованиях макак-резус.

Анализ популяционной структуры

Для оценки генетической структуры референсной панели был проведен анализ главных компонент (PCA) на основе 33457491 SNP-маркера. Первая главная компонента (PC1, 68,5% общей дисперсии) четко разделяет образцы индийского и китайского происхождения на два обособленных кластера (рис. 2), что согласуется с ранее опубликованными данными о значительной генетической дивергенции между двумя основными географическими линиями *M. mulatta* [27]. Вторая главная компонента (PC2, 5,2% дисперсии) выявляет дополнительную структуру внутри каждой из групп: образцы индийского происхождения демонстрируют относительно компактное распределение, тогда как китайские образцы характеризуются большим разбросом вдоль PC2, что соответствует более высокой генетической гетерогенности восточноазиатской линии вследствие ее подвидового разнообразия [28].

Апробация панели на независимых образцах

Для апробации панели на независимых данных была проведена импутация генотипов 10 особей *M. mulatta* из коллекции Курчатовского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт», не входивших в состав референсной панели. Секвенирование выполняли со средним покрытием 0,6х, что соответствует схеме

эксперимента, обеспечивающей оптимальный баланс между стоимостью и достоверностью генотипирования при использовании секвенирования с низким покрытием [7, 12]. Импутацию выполняли с использованием алгоритма GLIMPSE2 на созданной референсной панели.

Качество импутации оценивали по показателю INFO/RSQ, отражающему степень статистической уверенности для каждого импутированного варианта и принимающему значения от 0 до 1. В исследованной выборке значения INFO/RSQ варьировали от 0,862 до 0,934 при среднем значении 0,898. Все идентифицированные варианты характеризовались значениями INFO > 0,8, соответствующими строгому порогу отбора для частых и среднечастотных вариантов [29, 30].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе создана и валидирована фазированная референсная панель гаплотипов для импутации генотипов у *Macaca mulatta*, включающая 618 особей и 33,4 млн SNP-маркеров, обработанных по единому стандартизированному пайплайну. Среди доступных ресурсов для импутации генотипов данного вида следует выделить панель из 741 особи индийской линии [13] и масштабную когорту из 919 китайских макак с фенотипическими данными, представляющую собой ресурс, ориентированный на GWAS, но не представляющий собой единой фазированной импутационной панели [31]. Оба ресурса не охватывают обе географические линии вида в рамках единого стандартизированного пайплайна обработки. Между тем значительная часть лабораторных популяций *M. mulatta* в исследовательских центрах мира формировалась на протяжении десятилетий путем завоза животных из разных регионов и последующего

неконтролируемого скрещивания, что нередко приводило к неизвестному или смешанному происхождению животных [14, 27, 32]. Это обуславливает практическую потребность именно в интегрированном ресурсе, охватывающем обе линии, разработанном в настоящей работе.

Полученные показатели точности импутации полностью согласуются с опубликованными данными. Наибольшая точность достигнута для образцов индийского происхождения: R^2 0,95–0,96 для частых вариантов уже при покрытии 0,7х, что сопоставимо с результатами, полученными по индийской панели [13]. Для китайской линии показатели несколько ниже, что закономерно отражает ее меньшую представленность. Разработанная панель значительно превосходит ранее доступные ресурсы по плотности маркеров, обеспечивая покрытие более 33 млн SNP, что соответствует уровню современных референсных панелей для сельскохозяйственных животных и открывает возможности для высокоразрешающего популяционного и ассоциативного анализа. При покрытии уже 0,6х панель обеспечивает качество импутации, сопоставимое с коммерческими SNP-чипами, что делает подход экономически эффективным для генотипирования больших когорт.

Практическая ценность созданного ресурса определяется широким спектром биомедицинских задач, в которых *M. mulatta* выступает основной моделью: изучение инфекционных заболеваний, исследования в области нейробиологии, фармакологии и токсикологии. Полногеномное генотипирование на основе импутации открывает возможность популяционного скрининга животных на носительство вариантов, ортологических патогенных мутаций человека [33], а также контроля межиндивидуальной фармакокинетической вариабельности, обусловленной полиморфными вариантами ферментов метаболизма лекарственных веществ [34]. Этот подход доказал свою эффективность и на других модельных и сельскохозяйственных видах. Для крупного рогатого скота создана мультипородная панель на выборке из 2976 животных, включающая 61,8 млн SNP-маркеров. При использовании алгоритма GLIMPSE2, также примененного в данной работе, эта панель продемонстрировала конкордантность более 99% уже при покрытии 0,1х [35]. Для свиней описаны панели SWIM (2259 особей из 44 пород) [36] и PHARP, построенная на основе данных 1181 особи из 71 популяции [37]. Все эти панели сформированы путем объединения данных нескольких общедоступных проектов по генотипированию различных популяций, что соответствует подходу, реализованному в настоящем исследовании. Растущий интерес к данному направлению отмечается и в отечественных исследованиях: перспективы секвенирования с низким покрытием для геномной селекции крупного рогатого скота обсуждаются в обзоре российских авторов [38], а импутированные полногеномные данные уже

применяются для ассоциативного анализа хозяйственно значимых признаков в российских стадах [39]. Успешный опыт создания подобных ресурсов для других видов подтверждает, что разработанный в настоящей работе биоинформатический пайплайн воспроизводим и может быть адаптирован для создания аналогичных панелей для других видов приматов, применяемых в биомедицинских исследованиях.

Основные направления развития ресурса — расширение китайской компоненты панели на основе общедоступных данных, а также включение образцов из отечественных приматологических коллекций, что позволит повысить точность импутации для популяций со смешанным происхождением. Созданная референсная панель и разработанный биоинформатический подход закладывают инфраструктурную основу для проведения масштабных полногеномных ассоциативных и популяционно-генетических исследований на макаках-резус в отечественных лабораториях.

Ограничения исследования

К числу основных ограничений выполненной работы относятся неравномерная представленность географических линий в составе панели: количество образцов индийского происхождения (418) более чем в два раза превышает число китайских (200). Это обусловило более высокую точность импутации для индийской линии. Кроме того, панель сформирована на основе данных зарубежных репозиториях (BCM, OHSU, KIZ), в связи с чем для более точного отражения локальных популяций требуется последующее включение образцов из отечественных приматологических коллекций. Оценка точности методом искусственного прореживания выполнена на двух образцах в диапазоне покрытия 0,1–0,9х, тогда как апробация на реальных данных низкого покрытия проведена на 10 независимых образцах при среднем покрытии 0,6х. В связи с этим дальнейшая проверка на более крупной и гетерогенной выборке позволит дополнительно подтвердить воспроизводимость полученных результатов.

Выводы

Создана и валидирована фазированная референсная панель гаплотипов для импутации генотипов у *Macaca mulatta*, включающая 618 особей и 33,4 млн SNP-маркеров обеих основных географических линий вида, обработанных по единому стандартизированному пайплайну. Панель обеспечивает высокую точность импутации при сверхнизком покрытии и готова к практическому применению в популяционно-генетических и ассоциативных исследованиях. Разработанный пайплайн может служить шаблоном для создания аналогичных ресурсов для других видов приматов, используемых в биомедицинских исследованиях.

Литература

- Gardner MB, Luciw PA. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J*. 2008; 49: 220–55. Available from: <https://doi.org/10.1093/ilar.49.2.220>.
- Joho D, Sato K, Kumita W, Saido TC, Sasaki E, Sasaguri H. Advances in non-human primate models for Alzheimer's disease research. *Neurosci Res*. 2025; 221: 104984. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2025.104984>.
- Vallender EJ, Hotchkiss CE, Lewis AD, Rogers J, Stern JA, Peterson SM, et al. Nonhuman primate genetic models for the study of rare diseases. *Orphanet J Rare Dis*. 2023; 18: 20. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02619-3>.
- Warren WC, Harris RA, Haukness M, Fiddes IT, Murali SC, Fernandes J, et al. Sequence diversity analyses of an improved rhesus macaque genome enhance its biomedical utility. *Science*. N.Y. 2020; 370: eabc6617. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abc6617>.
- Bimber BN, Yan MY, Peterson SM, Ferguson B. mGAP: the macaque genotype and phenotype resource, a framework for accessing and interpreting macaque variant data, and identifying new models of human disease. *BMC Genomics*. 2019; 20: 176. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5559-7>.
- Bimber BN, Raboin MJ, Letaw J, Nevenon KA, Spindel JE, McCouch SR, et al. Whole-genome characterization in pedigreed non-human primates using genotyping-by-sequencing (GBS) and imputation. *BMC Genomics*. 2016; 17: 676. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2966-x>.
- Rubinacci S, Ribeiro DM, Hofmeister RJ, Delaneau O. Efficient phasing and imputation of low-coverage sequencing data using large reference panels. *Nat Genet*. 2021; 53: 120–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00756-0>.
- Mitt M, Kals M, Pärn K, Gabriel SB, Lander ES, Palotie A, et al. Improved imputation accuracy of rare and low-frequency variants using population-specific high-coverage WGS-based imputation reference panel. *Eur J Hum Genet*. 2017; 25: 869–76. Available from: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.51>.
- Zhong X, Peng J, Shen QS, Chen J-Y, Gao H, Luan X, et al. RhesusBase PopGateway: Genome-Wide Population Genetics Atlas in Rhesus Macaque. *Mol Biol Evol*. 2016; 33: 1370–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw025>.
- Du L, Guo T, Liu Q, Li J, Zhang X, Xing J, et al. MACSNVdb: a high-quality SNV database for interspecies genetic divergence investigation among macaques. *Database (Oxford)*. 2020; 2020: baaa027. Available from: <https://doi.org/10.1093/database/baaa027>.
- Quick C, Anugu P, Musani S, Weiss ST, Burchard EG, White MJ, et al. Sequencing and imputation in GWAS: Cost-effective strategies to increase power and genomic coverage across diverse populations. *Genet Epidemiol*. 2020; 44: 537–49. Available from: <https://doi.org/10.1002/gepi.22326>.
- Pasaniuc B, Rohland N, McLaren PJ, Garimella K, Zaitlen N, Li H, et al. Extremely low-coverage sequencing and imputation increases power for genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2012; 44: 631–5. Available from: <https://doi.org/10.1038/ng.2283>.
- Watowich MM, Chiou KL, Graves B, Montague MJ, Brent LJN, Higham JP, et al. Best practices for genotype imputation from low-coverage sequencing data in natural populations. *Mol Ecol Resour*. 2025; 25: e13854. Available from: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13854>.
- Kanthaswamy S, Trask JS, Ross CT, Kou A, Houghton P, Smith DG, et al. A large-scale SNP-based genomic admixture analysis of the captive rhesus macaque colony at the California National Primate Research Center. *Am J Primatol*. 2012; 74: 747–57. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajp.22025>.
- Kanthaswamy S, Satkoski J, Kou A, Malladi V, Glenn Smith D. Detecting signatures of inter-regional and inter-specific hybridization among the Chinese rhesus macaque specific pathogen-free (SPF) population using single nucleotide polymorphism (SNP) markers. *J Med Primatol*. 2010; 39: 252–65. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2010.00430.x>.
- Wang J, Wang M, Moshiri A, Harris RA, Raveendran M, Nguyen T, et al. Genetic diversity of 1,845 rhesus macaques improves genetic variation interpretation and identifies disease models. *Nat Commun*. 2024; 15: 5658. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49922-6>.
- Rogers J. Genomic resources for rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Mamm Genome*. 2022; 33: 91–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00335-021-09922-z>.
- Katz K, Shutov O, Lapoint R, Kimelman M, Brister JR, O'Sullivan C. The Sequence Read Archive: a decade more of explosive growth. *Nucleic Acids Res*. 2022; 50: D387–90. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1053>.
- David Y, Alisha A, Awais A, Rajkumar D, Dipayan G, Muhammad H, et al. The European Nucleotide Archive in 2025. *Nucleic Acids Res*. 2026; 54: D120–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1295>.
- CNCB-NGDC Members and Partners. Database Resources of the National Genomics Data Center, China National Center for Bioinformation in 2025. *Nucleic Acids Res*. 2025; 53: D30–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf978>.
- Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018; 34: 1884–90. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
- Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9: 357–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*. 2021; 10: giab008. Available from: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>.
- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011; 27: 2156–8. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>.
- Hofmeister RJ, Ribeiro DM, Rubinacci S, Delaneau O. Accurate rare variant phasing of whole-genome and whole-exome sequencing data in the UK Biobank. *Nat Genet*. Nature Publishing Group. 2023; 55: 1243–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01415-w>.
- Rubinacci S, Hofmeister RJ, Sousa da Mota B, Delaneau O. Imputation of low-coverage sequencing data from 150,119 UK Biobank genomes. *Nat Genet*. 2023; 55: 1088–90. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01438-3>.
- Smith DG. Genetic characterization of Indian-origin and Chinese-origin rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comp Med*. 2005; 55: 227–30.
- Liu Z, Tan X, Orozco-terWengel P, Zhou X, Zhang L, Tian S, et al. Population genomics of wild Chinese rhesus macaques reveals a dynamic demographic history and local adaptation, with implications for biomedical research. *Gigascience*. 2018; 7: giy106. Available from: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy106>.
- Stahl K, Papiol S, Budde M, Heilbronner M, Oraki Kohshour M, Falkai P, et al. Aggregating single nucleotide polymorphisms improves filtering for false-positive associations postimputation. *G3 (Bethesda)*. Bethesda, Md. 2025; 15: jkaf043. Available from: <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaf043>.
- Fu J, Zhang Q, Wang J, Wang M, Zhang B, Zhu W, и др. Cross-ancestry genome-wide association studies of brain imaging phenotypes. *Nat Genet*. 2024; 56: 1110–20. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01766-y>.
- Zhang B-L, Chen Y, Zhang Y, Qiao Y, Wu Y, Zhang Y, et al. Forward and reverse genomic screens enhance the understanding of phenotypic variation in a large Chinese rhesus macaque cohort. *Nat Commun*. Nature Publishing Group. 2025; 16: 8703. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63747-x>.
- Lyke MM, Bagwell A, Newman D, Galindo S, Church T, Christensen C, et al. Mergers and migrations: drivers of population genetic structure in a captive rhesus macaque colony. *BMC Genomics*. 2026; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-026-13090-2>.
- Wang J, Wang M, Moshiri A, Harris RA, Raveendran M, Nguyen T, et al. Genetic diversity of 1,845 rhesus macaques improves genetic variation interpretation and identifies disease models. *Nat Commun*. 2024; 15: 5658. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49922-6>.
- Uno Y, Uehara S, Yamazaki H. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in cynomolgus and rhesus monkeys and common marmosets in preclinical studies

- for humans. *Biochem Pharmacol.* 2018; 153: 184–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.015>.
35. Zhang Z, Wang A, Hu H, Wang L, Gong M, Yang Q, et al. The efficient phasing and imputation pipeline of low-coverage whole genome sequencing data using a high-quality and publicly available reference panel in cattle. *Animal Research and One Health.* 2023; 1: 4–16. Available from: <https://doi.org/10.1002/aro2.8>.
 36. Ding R, Savegnago R, Liu J, Long N, Tan C, Cai G, et al. The SWine IMputation (SWIM) haplotype reference panel enables nucleotide resolution genetic mapping in pigs. *Commun Biol.* 2023; 6: 577. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04933-9>.
 37. Wang Z, Zhang Z, Chen Z, Sun J, Cao C, Wu F, et al. PHARP: a pig haplotype reference panel for genotype imputation. *Sci Rep.* 2022; 12: 12645. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15851-x>.
 38. Kostyunina O, Koldichev N, Nemkovskiy G, Traspov A, Ermilov A, Bakoev F, et al. Low-Coverage Whole-Genome Sequencing (lcWGS) in Cattle: Analysis of Potential and Prospects for Application. *Animals (Basel).* 2025; 15: 3538. Available from: <https://doi.org/10.3390/ani15243538>.
 39. Genome-wide association study of carcass traits in an Angus beef cattle Russian herd using imputed Whole-Genome Sequence data. The Thirteenth International Multiconference. Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 2022 [дата обращения: 4 август 2026 г.]. Available from: <https://doi.org/10.18699/SBB-2022-397>.
- ## References
1. Gardner MB, Luciw PA. Macaque models of human infectious disease. *ILAR J.* 2008; 49: 220–55. Available from: <https://doi.org/10.1093/ilar.49.2.220>.
 2. Joho D, Sato K, Kumita W, Saido TC, Sasaki E, Sasaguri H. Advances in non-human primate models for Alzheimer's disease research. *Neurosci Res.* 2025; 221: 104984. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2025.104984>.
 3. Vallender EJ, Hotchkiss CE, Lewis AD, Rogers J, Stern JA, Peterson SM, et al. Nonhuman primate genetic models for the study of rare diseases. *Orphanet J Rare Dis.* 2023; 18: 20. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02619-3>.
 4. Warren WC, Harris RA, Haukness M, Fiddes IT, Murali SC, Fernandes J, et al. Sequence diversity analyses of an improved rhesus macaque genome enhance its biomedical utility. *Science, N.Y.* 2020; 370: eabc6617. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.abc6617>.
 5. Bimber BN, Yan MY, Peterson SM, Ferguson B. mGAP: the macaque genotype and phenotype resource, a framework for accessing and interpreting macaque variant data, and identifying new models of human disease. *BMC Genomics.* 2019; 20: 176. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5559-7>.
 6. Bimber BN, Raboin MJ, Letaw J, Nevenon KA, Spindel JE, McCouch SR, et al. Whole-genome characterization in pedigreed non-human primates using genotyping-by-sequencing (GBS) and imputation. *BMC Genomics.* 2016; 17: 676. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2966-x>.
 7. Rubinacci S, Ribeiro DM, Hofmeister RJ, Delaneau O. Efficient phasing and imputation of low-coverage sequencing data using large reference panels. *Nat Genet.* 2021; 53: 120–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00756-0>.
 8. Mitt M, Kals M, Pärn K, Gabriel SB, Lander ES, Palotie A, et al. Improved imputation accuracy of rare and low-frequency variants using population-specific high-coverage WGS-based imputation reference panel. *Eur J Hum Genet.* 2017; 25: 869–76. Available from: <https://doi.org/10.1038/ejhg.2017.51>.
 9. Zhong X, Peng J, Shen QS, Chen J-Y, Gao H, Luan X, et al. RhesusBase PopGateway: Genome-Wide Population Genetics Atlas in Rhesus Macaque. *Mol Biol Evol.* 2016; 33: 1370–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw025>.
 10. Du L, Guo T, Liu Q, Li J, Zhang X, Xing J, et al. MACSNDVdb: a high-quality SNV database for interspecies genetic divergence investigation among macaques. *Database (Oxford).* 2020; 2020: baaa027. Available from: <https://doi.org/10.1093/database/baaa027>.
 11. Quick C, Anugu P, Musani S, Weiss ST, Burchard EG, White MJ, et al. Sequencing and imputation in GWAS: Cost-effective strategies to increase power and genomic coverage across diverse populations. *Genet Epidemiol.* 2020; 44: 537–49. Available from: <https://doi.org/10.1002/gepi.22326>.
 12. Pasaniuc B, Rohland N, McLaren PJ, Garimella K, Zaitlen N, Li H, et al. Extremely low-coverage sequencing and imputation increases power for genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2012; 44: 631–5. Available from: <https://doi.org/10.1038/ng.2283>.
 13. Watowich MM, Chiou KL, Graves B, Montague MJ, Brent LJJ, Higham JP, et al. Best practices for genotype imputation from low-coverage sequencing data in natural populations. *Mol Ecol Resour.* 2025; 25: e13854. Available from: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13854>.
 14. Kanthaswamy S, Trask JS, Ross CT, Kou A, Houghton P, Smith DG, et al. A large-scale SNP-based genomic admixture analysis of the captive rhesus macaque colony at the California National Primate Research Center. *Am J Primatol.* 2012; 74: 747–57. Available from: <https://doi.org/10.1002/ajp.22025>.
 15. Kanthaswamy S, Satkoski J, Kou A, Malladi V, Glenn Smith D. Detecting signatures of inter-regional and inter-specific hybridization among the Chinese rhesus macaque specific pathogen-free (SPF) population using single nucleotide polymorphic (SNP) markers. *J Med Primatol.* 2010; 39: 252–65. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2010.00430.x>.
 16. Wang J, Wang M, Moshiri A, Harris RA, Raveendran M, Nguyen T, et al. Genetic diversity of 1,845 rhesus macaques improves genetic variation interpretation and identifies disease models. *Nat Commun.* 2024; 15: 5658. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49922-6>.
 17. Rogers J. Genomic resources for rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Mamm Genome.* 2022; 33: 91–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00335-021-09922-z>.
 18. Katz K, Shutov O, Lapoint R, Kimelman M, Brister JR, O'Sullivan C. The Sequence Read Archive: a decade more of explosive growth. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50: D387–90. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1053>.
 19. David Y, Alisha A, Awais A, Rajkumar D, Dipayan G, Muhammad H, et al. The European Nucleotide Archive in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2026; 54: D120–7. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaf1295>.
 20. CNCB-NGDC Members and Partners. Database Resources of the National Genomics Data Center, China National Center for Bioinformation in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2025; 53: D30–44. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae978>.
 21. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018; 34: 1884–90. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>.
 22. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012; 9: 357–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
 23. Danecek P, Bonfield JK, Liddle J, Marshall J, Ohan V, Pollard MO, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience.* 2021; 10: giab008. Available from: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>.
 24. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011; 27: 2156–8. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>.
 25. Hofmeister RJ, Ribeiro DM, Rubinacci S, Delaneau O. Accurate rare variant phasing of whole-genome and whole-exome sequencing data in the UK Biobank. *Nat Genet.* 2023; 55: 1243–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01415-w>.
 26. Rubinacci S, Hofmeister RJ, Sousa da Mota B, Delaneau O. Imputation of low-coverage sequencing data from 150,119 UK Biobank genomes. *Nat Genet.* 2023; 55: 1088–90. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01438-3>.
 27. Smith DG. Genetic characterization of Indian-origin and Chinese-origin rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comp Med.* 2005; 55: 227–30.
 28. Liu Z, Tan X, Orozco-terWengel P, Zhou X, Zhang L, Tian S,

- et al. Population genomics of wild Chinese rhesus macaques reveals a dynamic demographic history and local adaptation, with implications for biomedical research. *Gigascience*. 2018; 7: giy106. Available from: <https://doi.org/10.1093/gigascience/giy106>.
29. Stahl K, Papiol S, Budde M, Heilbronner M, Oraki Kohshour M, Falkai P, et al. Aggregating single nucleotide polymorphisms improves filtering for false-positive associations postimputation. *G3* (Bethesda). Bethesda, Md. 2025; 15: jkaf043. Available from: <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkaf043>.
 30. Fu J, Zhang Q, Wang J, Wang M, Zhang B, Zhu W, и др. Cross-ancestry genome-wide association studies of brain imaging phenotypes. *Nat Genet*. 2024; 56: 1110–20. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01766-y>.
 31. Zhang B-L, Chen Y, Zhang Y, Qiao Y, Wu Y, Zhang Y, et al. Forward and reverse genomic screens enhance the understanding of phenotypic variation in a large Chinese rhesus macaque cohort. *Nat Commun*. Nature Publishing Group. 2025; 16: 8703. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-025-63747-x>.
 32. Lyke MM, Bagwell A, Newman D, Galindo S, Church T, Christensen C, et al. Mergers and migrations: drivers of population genetic structure in a captive rhesus macaque colony. *BMC Genomics*. 2026; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12864-026-13090-2>.
 33. Wang J, Wang M, Moshiri A, Harris RA, Raveendran M, Nguyen T, et al. Genetic diversity of 1,845 rhesus macaques improves genetic variation interpretation and identifies disease models. *Nat Commun*. 2024; 15: 5658. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49922-6>.
 34. Uno Y, Uehara S, Yamazaki H. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in cynomolgus and rhesus monkeys and common marmosets in preclinical studies for humans. *Biochem Pharmacol*. 2018; 153: 184–95. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.12.015>.
 35. Zhang Z, Wang A, Hu H, Wang L, Gong M, Yang Q, et al. The efficient phasing and imputation pipeline of low-coverage whole genome sequencing data using a high-quality and publicly available reference panel in cattle. *Animal Research and One Health*. 2023; 1: 4–16. Available from: <https://doi.org/10.1002/aro2.8>.
 36. Ding R, Savegnago R, Liu J, Long N, Tan C, Cai G, et al. The SWine IMputation (SWIM) haplotype reference panel enables nucleotide resolution genetic mapping in pigs. *Commun Biol*. 2023; 6: 577. Available from: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04933-9>.
 37. Wang Z, Zhang Z, Chen Z, Sun J, Cao C, Wu F, et al. PHARP: a pig haplotype reference panel for genotype imputation. *Sci Rep*. 2022; 12: 12645. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15851-x>.
 38. Kostyunina O, Koldichev N, Nemkovskiy G, Traspov A, Ermilov A, Bakoev F, et al. Low-Coverage Whole-Genome Sequencing (lcWGS) in Cattle: Analysis of Potential and Prospects for Application. *Animals* (Basel). 2025; 15: 3538. Available from: <https://doi.org/10.3390/ani15243538>.
 39. Genome-wide association study of carcass traits in an Angus beef cattle Russian herd using imputed Whole-Genome Sequence data. The Thirteenth International Multiconference. Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 2022 [дата обращения: 4 август 2026 г.]. Available from: <https://doi.org/10.18699/SBB-2022-397>.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ РАННИХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПОТЕРЬ

О. В. Юсеф¹, Б. Р. Ибрагимов², М. П. Клименко¹✉, А. А. Герасимова³, А. Б. Айметдинова¹, Е. Г. Марнат¹, Д. Д. Абрамов⁴, П. А. Клименко¹, М. А. Курцер¹

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

² Дагестанский государственный медицинский университет, Махачкала, Россия

³ Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, Москва, Россия

⁴ Институт иммунологии Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

Замершая беременность относится к числу наиболее распространенных форм ранних репродуктивных потерь и остается актуальной проблемой акушерства и гинекологии. Несмотря на достижения в области репродуктивной медицины, молекулярные механизмы, лежащие в основе прекращения развития эмбриона на ранних сроках гестации, изучены недостаточно. Целью сравнительного одноцентрового исследования было оценить уровень экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* в периферической крови женщин с физиологической и замершей беременностью и определить их потенциальную прогностическую значимость при оценке риска ранних репродуктивных потерь. В исследование были включены 40 беременных женщин: 20 пациенток с физиологически протекающей беременностью сроком 9–11 недель (контрольная группа) и 20 женщин с диагнозом замершей беременности (основная группа). Уровень экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени после выделения тотальной РНК из периферической крови. Для статистической обработки результатов использовали критерий Манна–Уитни и ROC-анализ. Статистически значимых различий между исследуемыми группами по уровням экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* выявлено не было. Вместе с тем ROC-анализ позволил определить пороговые значения исследуемых показателей, обладающие определенной диагностической информативностью. Для *MMP-9* наиболее информативным оказалось значение $Ct \leq 29$, обеспечивающее чувствительность 80% и специфичность 60%. Для *TGF-β* пороговое значение $Ct \leq 27,4$ характеризовалось чувствительностью 75% и специфичностью 70%. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной прогностической значимости исследуемых генов при оценке риска замершей беременности.

Ключевые слова: экспрессия генов *TGF-β* и *MMP-9*, физиологическая и замершая беременность, прогнозирование течения беременности

Финансирование: работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.) (№ 122030100170-5).

Вклад авторов: О. В. Юсеф — сбор клинического материала, проведение лабораторных исследований; Б. Р. Ибрагимов — статистическая обработка, анализ результатов; М. П. Клименко — формирование базы данных; А. А. Герасимова — ультразвуковое исследование, клиническая оценка результатов; А. Б. Айметдинова — клинико-функциональное обследование пациентов; Е. Г. Марнат — проведение лабораторных исследований (ПЦР); Д. Д. Абрамов — анализ литературы, интерпретация результатов, подготовка текста рукописи; П. А. Клименко — дизайн исследования, организация клинического этапа, интерпретация результатов; М. А. Курцер — концепция и дизайн исследования, научное руководство, утверждение рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н. И. Пирогова (протокол № 258 от 16 февраля 2026 г.). Все обследованные подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ Для корреспонденции: Петр Афанасьевич Клименко
Севастопольский пр-т, д. 24а, г. Москва, 117209; pa.klimenko@mail.ru

Статья получена: 24.06.2026 **Статья принята к печати:** 05.08.2026 **Опубликована онлайн:** 18.08.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.043

Авторские права: © 2026 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

MOLECULAR GENETIC ASPECTS OF PREDICTING EARLY PREGNANCY LOSS

Yusef OV¹, Ibragimov BR², Klimenko MP¹✉, Gerasimova AA³, Aimetdinova AB¹, Marnat EG¹, Abramov DD⁴, Klimenko PA¹, Kurtser MA¹

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Dagestan State Medical University, Makhachkala, Russia

³ Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

⁴ Institute of Immunology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

Missed abortion is one of the most prevalent forms of early pregnancy loss that remains a pressing issue of obstetrics and gynecology. Despite advances in reproductive medicine, the molecular mechanisms underlying the embryo development termination in early gestation are poorly understood. A comparative single-center study aimed to assess the expression of *TGF-β* and *MMP-9* genes in peripheral blood of women with physiological and missed abortion and assess their potential prognostic value for evaluation of the risk of early pregnancy loss. A total of 40 pregnant women were included in the study: 20 patients with the 9–11 week physiological pregnancy (control group) and 20 women diagnosed with missed abortion (index group). The *TGF-β* and *MMP-9* gene expression was determined by the real-time polymerase chain reaction method after the total RNA isolation from peripheral blood. The Mann–Whitney U-test and ROC analysis were used for statistical data processing. No significant differences in the *TGF-β* and *MMP-9* gene expression between the studied groups were revealed. At the same time, ROC analysis made it possible to determine the threshold values of the studied indicators having some diagnostic information content. As for *MMP-9*, the threshold value $Ct \leq 29$ ensuring the 80% sensitivity and 60% specificity turned out to be the most informative. As for *TGF-β*, the threshold value $Ct \leq 27.4$ was characterized by the 75% sensitivity and 70% specificity. The findings suggest the potential prognostic value of the studied genes for evaluation of the risk of missed abortion.

Keywords: expression of *TGF-β* and *MMP-9* genes, missed abortion, physiological pregnancy, prognosis of pregnancy course

Funding: the study was conducted as part of the Program for Basic Research in the Russian Federation for the Long Term (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Author contribution: Yusef OV — clinical material collection, laboratory testing; Ibragimov BR — statistical processing, analysis of results; Klimenko MP — database creation; Gerasimova AA — ultrasound examination, clinical assessment of results; Aimetdinova AB — clinical and functional assessment of patients; Marnat EG — laboratory testing (PCR); Abramov DD — literature review, interpretation of results, manuscript writing; Klimenko PA — study design, clinical phase arrangement, interpretation of results; Kurtser MA — study concept and design, academic advising, manuscript approval.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol No. 258 dated February 16, 2026). All the surveyed individuals submitted the informed consent to take part in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pyotr A. Klimenko
Sevastopolsky prospekt, 24a, Moscow, 117209; pa.klimenko@mail.ru

Received: 24.06.2026 **Accepted:** 05.08.2026 **Published online:** 18.08.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.043

Copyright: © 2026 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/>).

Замершая беременность является одной из наиболее значимых проблем современной репродуктивной медицины и занимает важное место в структуре ранних репродуктивных потерь. Несмотря на совершенствование методов диагностики и лечения, частота данной патологии остается высокой. Нарушение развития эмбриона на ранних сроках гестации обусловлено комплексом генетических, иммунологических, эндокринных, инфекционных и сосудистых факторов, вклад каждого из которых может различаться в зависимости от конкретной клинической ситуации.

Нормальное течение беременности обеспечивается согласованным взаимодействием между организмом матери и развивающимся эмбрионом. Успешная имплантация и дальнейшее формирование плацентарного комплекса требуют адекватной инвазии трофобласта, ремоделирования внеклеточного матрикса, формирования сосудистой сети и поддержания иммунологической толерантности. Нарушение любого из указанных процессов может привести к прекращению развития беременности.

В ранее выполненных исследованиях выявлены молекулярные особенности тканей, полученных при замершей беременности. Установлено, что ранние репродуктивные потери сопровождаются изменениями содержания рибосомной ДНК [1, 2], нарушением экспрессии ряда плацентоспецифических белков семейства PSG [3, 4], а также снижением экспрессии белка ретикулона-4 (RTN4), участвующего в регуляции процессов апоптоза и клеточной дифференцировки. Полученные результаты свидетельствуют о наличии комплексных молекулярных нарушений, затрагивающих различные этапы эмбрионального развития и формирования плаценты

[1–6]. Вместе с тем механизмы иммунной регуляции и ремоделирования тканей при замершей беременности остаются недостаточно изученными. В связи с этим особый интерес представляют гены трансформирующего фактора роста β (*TGF- β*) и матриксной металлопротеиназы 9 (*MMP-9*), играющие важную роль в обеспечении иммунологической толерантности, инвазии трофобласта и формировании плацентарного ложа.

MMP-9 является ферментом, участвующим в деградации компонентов внеклеточного матрикса. Ее активность имеет важное значение для миграции и инвазии трофобластических клеток, ремоделирования тканей эндометрия и формирования плацентарного комплекса. Нарушение регуляции *MMP-9* может сопровождаться дефектами плацентации и осложненным течением беременности [7–13].

Матриксная металлопротеиназа 9 играет также важную роль в миграции лейкоцитов, остеокластической резорбции костной ткани, принадлежит к семейству пептидаз M10A, функционирует как фактор роста, регулирующий клеточную дифференцировку, миграцию и клеточную смерть, активирует клеточные сигнальные каскады через CD63 и ITGB1. По данным STRING (рис. 1), она также участвует в белково-белковых взаимодействиях.

TGF- β относится к числу ключевых регуляторов клеточной пролиферации, дифференцировки и иммунного ответа. Во время беременности данный цитокин участвует в формировании иммунологической толерантности между организмом матери и плодом, ограничивая развитие избыточных иммунных реакций и способствуя сохранению беременности [14–25].

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных роли *TGF- β* и *MMP-9* в репродуктивных

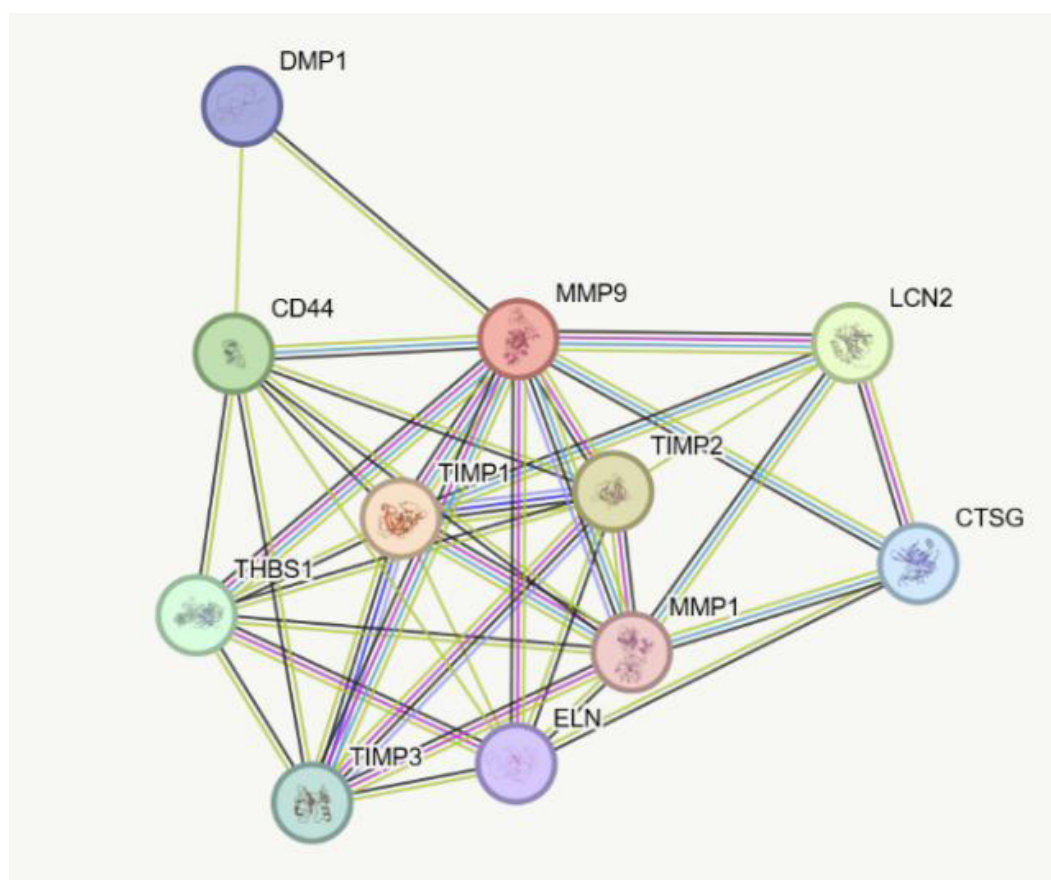


Рис. 1. Белково-белковые взаимодействия MMP-9. Участие биохимических взаимодействий MMP-9 с другими биологически активными веществами. Сеть взаимодействий построена с помощью ресурса STRING (<https://string-db.org>)

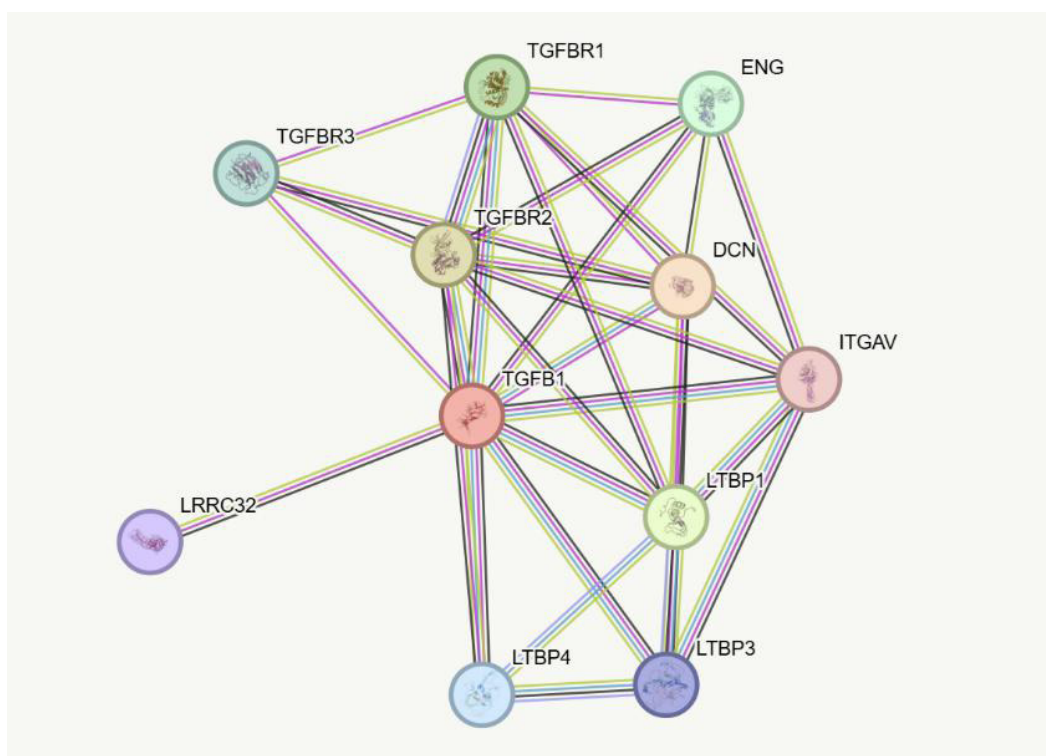


Рис. 2. Белково-белковые взаимодействия TGF- β . Участие биохимических взаимодействий TGF- β с другими биологически активными веществами. Сеть взаимодействий построена с помощью ресурса STRING (<https://string-db.org>).

процессах, сведения об особенностях их экспрессии при замершей беременности остаются ограниченными и во многом противоречивыми. Это определяет необходимость дальнейшего изучения данных молекулярных маркеров.

По данным STRING (рис. 2), TGF- β участвует в белково-белковых взаимодействиях следующим образом.

Между собой и совместно исследуемые гены (протеомы) практически не взаимодействуют (рис. 3).

Цель исследования — оценить уровень экспрессии генов (*TGF- β* и *MMP-9*) в периферической крови женщин с физиологической и замершей беременностью, а также определить их потенциальную прогностическую значимость при оценке риска ранних репродуктивных потерь.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования. Проведено сравнительное одноцентровое исследование, направленное на изучение экспрессии генов *TGF- β* и *MMP-9* в периферической крови женщин с физиологически протекающей и замершей беременностью.

Характеристика обследованных пациенток

В исследование были включены 40 беременных женщин. Контрольную группу составили 20 пациенток с одноплодной физиологически развивающейся беременностью сроком 9–11 недель, проходивших первый пренатальный скрининг. Основную группу составили 20 женщин с диагнозом замершей беременности. Замершую беременность обнаруживали в момент планового посещения и ультразвукового исследования, а срок ее устанавливали на основании анамнестических данных и УЗИ эмбриона. У 13 пациенток прекращение развития беременности произошло в сроки от 6 до

9 недель гестации, у 4 — в сроки от 9 до 12 недель. При этом было обнаружено несоответствие антропометрических данных по результатам ультразвукового исследования мертвых эмбрионов с гестационным возрастом 3–5 недель. У 3 пациенток было проведено прерывание беременности после консультации с генетиком и консилиума по медицинским показаниям (тератогенные эффекты) на сроке 13–21 неделя. Установление кариотипов плодов при аномалиях развития не проводилось. Критерии включения: возраст старше 18 лет; подтвержденная маточная беременность; подписанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: многоплодная беременность.

Получение биологического материала

У всех пациенток перед проведением оперативного лечения и ультразвукового исследования осуществляли забор периферической венозной крови из локтевой вены. Основной диагноз получали после обследования ткани эмбриона в цитогенетической лаборатории.

Выделение РНК и синтез кДНК

Для выделения тотальной РНК использовали цельную венозную кровь. После лизиса клеточных элементов

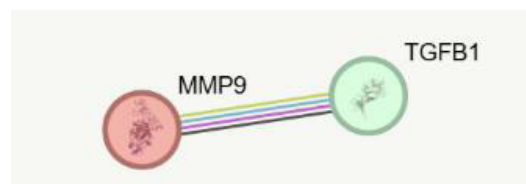


Рис. 3. Биологические взаимодействия TGF- β и MMP9 между собой в организме беременных. Сеть взаимодействий построена с помощью ресурса STRING (<https://string-db.org>).

Таблица. Описательная статистика экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* в крови пациенток при физиологической и замершей беременности

Параметр	Группа	Кол-во случаев	Среднее	Ст. ошибка (±)	Минимум	Максимум
Ct_TGFB	Замершая беременность	20	27,15	0,3	24,7	30,8
Ct_TGFB	Контроль	20	28,205	0,33	26	32,7
Ct_MMP9	Замершая беременность	20	27,805	0,42	25,4	32,1
Ct_MMP9	Контроль	20	29,31	0,37	26,2	32,4
Ct_B2M	Замершая беременность	20	19,935	0,37	17,9	24,8
Ct_B2M	Контроль	20	20,5	0,28	18,4	23,7
Ct_GUSB	Замершая беременность	20	28,265	0,37	25,9	33,4
Ct_GUSB	Контроль	20	29,47	0,37	26,2	33,1
Ctref	Замершая беременность	20	24,1	0,36	22,3	29,1
Ctref	Контроль	20	24,985	0,31	23	28,4
ΔCt_TGFB	Замершая беременность	20	3,05	0,21	1,2	4,9
ΔCt_TGFB	Контроль	20	3,22	0,2	2	6,1
ΔCt_MMP9	Замершая беременность	20	3,705	0,23	2,35	6,15
ΔCt_MMP9	Контроль	20	4,325	0,26	2,8	8,3

Примечание: Ct_TGFB — Ct-значение амплификации гена *TGF-β*, Ct_MMP9 — Ct-значение амплификации гена *MMP-9*.

образцы центрифугировали, а дальнейшее выделение РНК выполняли с использованием коммерческого набора ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество полученной РНК контролировали методом электрофореза. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически на приборе Nano500 (AllSheng, Китай). Для синтеза комплементарной ДНК применяли набор BioMaster RNAscribe RT Plus («Биолабмикс», Россия). В реакцию обратной транскрипции вносили 1 мкг тотальной РНК. После завершения реакции полученную кДНК разводили безнуклеазной водой и использовали для дальнейшего анализа экспрессии генов.

Определение экспрессии генов

Уровень экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* определяли методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Амплификацию проводили на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Все образцы анализировали в двух технических повторностях. Для повышения специфичности анализа посадку праймера проводили на экзон–экзон, что исключало амплификацию с геномной ДНК. В качестве референсных генов использовали *B2M* и *GUSB*. Относительный уровень экспрессии рассчитывали методом $\Delta\Delta Ct$ с последующей нормализацией по среднему значению референсных генов.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения StatPlus 2007. Для количественных показателей рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку среднего, медиану, минимальные и максимальные значения. Сравнение независимых групп проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Данный метод был выбран в связи с ограниченным объемом выборки и отсутствием необходимости предполагать нормальное распределение изучаемых признаков. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Для оценки диагностической информативности исследуемых показателей использовали ROC-анализ с определением оптимальных пороговых значений,

чувствительности и специфичности. Коррекцию на множественные сравнения не проводили. Исследование носило предварительный характер, поскольку размер выборки состоял из 20 человек в каждой группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен сравнительный анализ уровней экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* в периферической крови женщин с физиологически протекающей и замершей беременностью. При анализе пороговых циклов амплификации статистически значимых различий между группами выявлено не было (табл.). Среднее значение *Ct* для *TGF-β* в группе замершей беременности составило $27,15 \pm 0,30$, тогда как в контрольной группе данный показатель был равен $28,21 \pm 0,33$. Для гена *MMP-9* средние значения *Ct* составили $27,81 \pm 0,42$ и $29,31 \pm 0,37$ соответственно.

Следовательно, *TGFB* и *MMP-9* не имеют 100%-й диагностической ценности при прогнозировании замершей беременности, однако на самом деле данных больше, например, нами были точно рассчитаны границы интервалов, по которым удалось обнаружить очень тонкую разницу. Так, анализ параметров по риску «замершая беременность» (рис. 4) показал наиболее значимые различия по параметрам *Ct_TGFB* и *Ct_MMP9*.

Диагностически важное значение для *Ct_MMP9* имеет число ≤ 29 , при котором чувствительность достигает 80% при специфичности 60% (рис. 4). Для *Ct_TGFB* таким числом экспрессии является 27,4, при котором чувствительность достигает 75% при специфичности 70%. Прогнозирование замершей беременности по экспрессии *Ct_TGFB* и *Ct_MMP9* может довести до результата 80% / 70%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проведена оценка экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* в периферической крови женщин с физиологически протекающей и замершей беременностью. Несмотря на отсутствие статистически значимых различий между исследуемыми группами, результаты ROC-анализа продемонстрировали наличие пороговых значений исследуемых показателей, обладающих определенной прогностической информативностью. Полученные данные

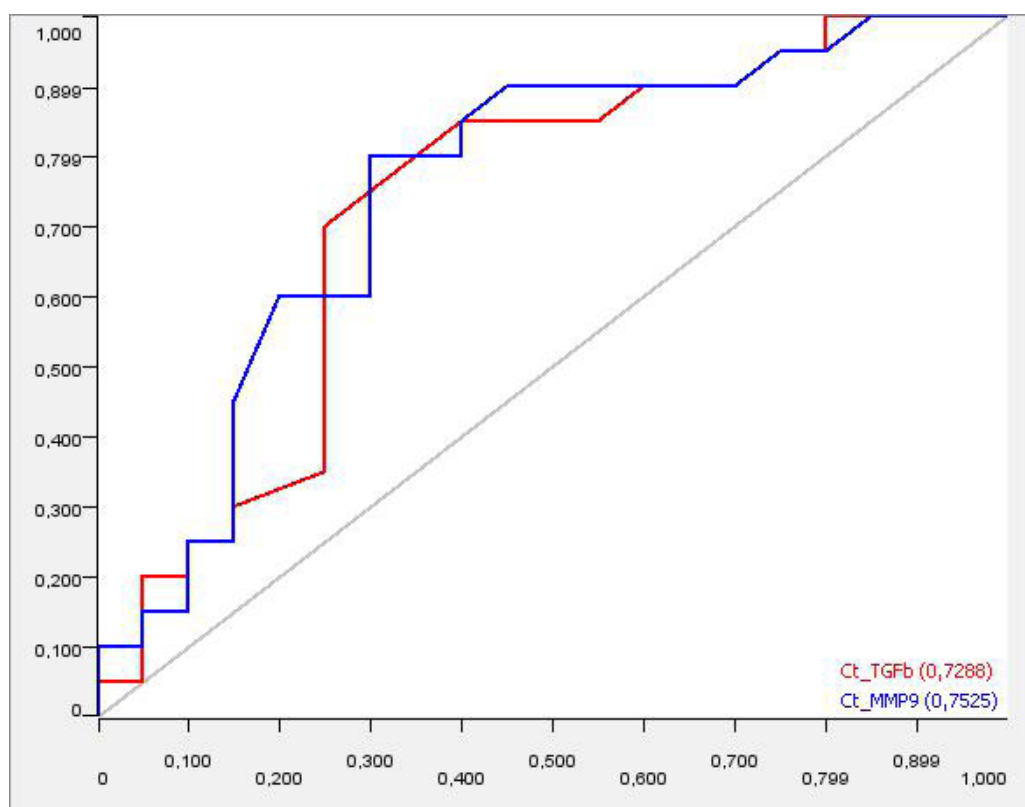


Рис. 4. ROC-кривые, характеризующие чувствительность и специфичность экспрессии Ct_TGFβ и Ct_MMP9 в успешности прогнозирования замершей беременности. Ось X — False positive rate (1-специфичность), ось Y — True positive rate (чувствительность)

свидетельствуют о том, что изменение экспрессии *TGF-β* и *MMP-9* не может быть рассмотрено как единственный механизм развития замершей беременности. Вероятно, выявляемые молекулярные изменения отражают лишь отдельные звенья сложного патогенетического процесса, включающего нарушения плацентации, иммунологической адаптации и межклеточных взаимодействий на материнско-плодовом интерфейсе [14–25].

Известно, что успешная имплантация эмбриона и дальнейшее развитие беременности требуют адекватной инвазии трофобласта в эндометрий и формирования полноценного маточно-плацентарного кровотока. Важная роль в этих процессах принадлежит матриксным металлопротеиназам, обеспечивающим контролируемое ремоделирование внеклеточного матрикса [7–13]. Среди представителей данного семейства особое значение имеет MMP-9, участвующая в деградации компонентов базальной мембраны, миграции трофобластических клеток и формировании плацентарного ложа [7–13].

По данным ряда исследований, активность MMP-9 тесно связана с процессами инвазии трофобласта и нормальным развитием плаценты [7–13]. Нарушение регуляции металлопротеиназ может приводить к неполноценной плацентации в разные сроки гестации плода и формированию осложнений беременности [7–13]. Полученные в настоящем исследовании данные о потенциальной прогностической значимости MMP-9 согласуются с современными представлениями о роли данного фермента в ранних этапах гестации.

Не менее важным компонентом успешного течения беременности является формирование иммунологической толерантности между организмом матери и плодом [15–25]. Центральное место в регуляции данного процесса занимает *TGF-β*, обладающий выраженными

иммуномодулирующими свойствами [15–25]. Этот цитокин участвует в контроле активности Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и других иммунокомпетентных клеток, обеспечивая поддержание иммунного баланса, необходимого для сохранения беременности [14–25].

Согласно данным литературы, снижение активности сигнальных путей *TGF-β* может сопровождаться нарушением материнско-плодовой иммунной толерантности и повышением риска невынашивания беременности [15–25]. Полученные нами результаты не выявили достоверных различий между группами из-за недостаточного количества измерений исследуемых показателей в разные сроки эмбриогенеза и плацентации, однако наличие диагностически значимого порогового значения позволяет предположить участие *TGF-β* в механизмах, связанных с риском прекращения развития беременности.

Следует учитывать, что патогенез замершей беременности имеет многофакторный характер [7–25]. Генетические нарушения эмбриона, эндокринные расстройства, инфекционные процессы, нарушения гемостаза и иммунологические изменения способны реализовываться одновременно, формируя различные клинические варианты заболевания. В связи с этим использование отдельных молекулярных маркеров не всегда обеспечивает высокую диагностическую точность. К ограничениям настоящего исследования следует отнести относительно небольшой объем выборки, а также неоднородность сроков беременности в группе пациенток с замершей беременностью. Кроме того, забор биологического материала проводили после установления диагноза, что не позволяет оценить динамику изменения экспрессии исследуемых генов на различных этапах патологического процесса.

Таким образом, полученные результаты подтверждают перспективность дальнейшего изучения *TGF-β* и *MMP-9*

как компонентов комплексных прогностических моделей оценки риска ранних репродуктивных потерь [7–25]. Для уточнения клинической значимости выявленных закономерностей необходимы исследования с включением большего числа наблюдений и расширенного спектра молекулярно-генетических показателей.

Проведенное исследование позволило оценить особенности экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* в периферической крови женщин с физиологически протекающей и замершей беременностью. Статистически значимых различий между группами по уровням экспрессии исследуемых генов выявлено не было. Вместе с тем результаты ROC-анализа показали наличие пороговых значений показателей *TGF-β* и *MMP-9*, обладающих определенной прогностической информативностью при оценке риска замершей беременности.

Полученные данные свидетельствуют о возможном участии исследуемых генов в молекулярных механизмах, обеспечивающих нормальное течение беременности. Однако ограниченный объем выборки не позволяет рассматривать выявленные закономерности как

окончательно доказанные. Дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение экспрессии *TGF-β* и *MMP-9* в более крупных и клинически однородных группах пациенток, а также на разработку комплексных прогностических моделей, объединяющих молекулярно-генетические, лабораторные и клинические показатели.

ВЫВОДЫ

Уровни экспрессии генов *TGF-β* и *MMP-9* в периферической крови женщин с физиологически протекающей и замершей беременностью статистически значимо не различались. Для гена *MMP-9* диагностически значимым оказалось пороговое значение $Ct \leq 29$, обеспечивающее чувствительность 80% и специфичность 60%. Для гена *TGF-β* наиболее информативным было значение $Ct \leq 27,4$ с чувствительностью 75% и специфичностью 70%. Полученные результаты свидетельствуют о потенциальной прогностической значимости данных молекулярных маркеров, необходимости дальнейших исследований для подтверждения их клинической ценности и валидации на независимой выборке.

Литература

- Malinovskaya EM, Ershova ES, Golimbet VE, Porokhovnik LN, Lyapunova NA, Kutsev SI, et al. Copy Number of Human Ribosomal Genes With Aging: Unchanged Mean, but Narrowed Range and Decreased Variance in Elderly Group. *Front Genet.* 2018; 9: 306. DOI: 10.3389/fgene.2018.00306. PMID: 30131826; PMCID: PMC6090032.
- Ляпунова Н. А., Вейко Н. Н. Рибосомные гены в геноме человека: идентификация четырех фракций, их локализация в ядрышке и метафазных хромосомах. *Генетика.* 2010; 46 (9): 1205–9.
- Мяо З., Чэнь М., У Х., Дин Х., Ши З. Сравнительный протеомный профиль человеческой плаценты в нормальном и фетальном росте. Рестрикционные субъекты. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 34: 1701–10.
- Тубаон Р., Хаддад П., Кирино Дж. Стратегии очистки образцов для приложений масс-спектрометрии ESI в восходящей протеомике: Тенденции с 2012 по 2016 год. *Протеомика.* 2017; 17: 1700011.
- Хорами Сарвестани С., Шоджаеян С., Ванак Н., Греси-Фард Б., Амини М., Джилани К., и др. Протеомное профилирование человеческой плаценты выявляет изменения в белковой сигнатуре, зависящие от стадии развития. *Клиническая протеомика.* 2021; 18: 18.
- Браунридж П., Бейнон Р. Важность дайджеста: протеолиз и абсолютная количественная оценка в протеомике. *Методы.* 2011; 54: 351–60.
- Matthielsen L, Kalkunte S, Sharma S. Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm. *Am J Reprod Immunol.* 2012; 67 (4): 334–40.
- Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 59.
- Moore CS, Crocker SJ. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am J Pathol.* 2012; 180: 12–16.
- Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Yamada O, Todoroki J, Sato T, et al. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008; 6: 66.
- Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution pattern of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem.* 2004; 5: 353–62.
- Diaz P, Solar P, Juica N, Orihuela P, Cardenas H, Christodoulides M, et al. Differential expression of extracellular matrix components in the Fallopian tubes throughout the menstrual cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012; 10: 56.
- Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Pliego A, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F. In vitro secretion and activity profiles of matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-2 in human term extra-placental membranes after exposure to *Escherichia coli*. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9: 13–15.
- Юсефзаде Й., Солтани-Зангбар М. С., Хемматзаде М., Шомали Н., Махмудпур А., Херис Дж. А., et al. Фетоматеринская иммунная толерантность: важнейшие механизмы толерантности для успешной беременности у человека. *Иммунолог. исследования.* 2022; 51: 1108–25.
- Муньюс-Суано А., Гамильтон А. Б., Бетц А. Г. Дайте мне убежище: иммунная система во время беременности. *Иммунологический обзор.* 2011; 241: 20–38.
- Пархизкар Ф., Мотавалли-Хиави Р., Агебати-Малеки Л., Пархизкар Пуракбари, Кафил Х. С., и др. Влияние новых иммунологических терапевтических стратегий на рецидивирующие выкидыши и рецидивирующие неудачи имплантации. *Иммунология. Письма.* 2021; 236: 20–30.
- Пархизкар Ф., Киани А., Дарзи С., Мотавалли Р., Долама Ф. Н., Юсефзаде Ю., и др. Оценка экспрессии CD39, CD73 и HIF-1α, а также родственных им микроРНК в РВМС женщин с привычным невынашиванием беременности. *Дж Репрод Иммунол.* 2023; 156: 103820.
- Нин Ф., Лю Х., Лаш Г. Е. Роль децидуальных макрофагов во время нормальной и патологической беременности. *Am J Reprod Immunol.* 2016; 75: 298–309.
- Ютель М., Акдис М., Будак Ф., Эбшиер-Касаулла К., Вжищ М., Блазер К., и др. IL-10 и TGF-β взаимодействуют в ответе регуляторных Т-клеток на слизистые аллергены при нормальном иммунитете и специфической иммунотерапии. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 1205–14.
- Хердер К., Зирер А., Кениг В., Роден М., Мейзингер К., Торанд Б. Трансформирующий фактор роста β1 и возникновение диабета 2 типа: результаты когортного исследования MONICA/KORA, 1984–2002 гг. *Diabetes Care.* 2009; 32: 1921–23.
- Чжу Дж., Сонг Г., Чжоу С., Хан Т.-Л., Ю С., Чен Х., и др. Нарушение регуляции метаболизма аденозина CD39/CD73 увеличивает цитотоксичность децидуальных естественных клеток-киллеров: последствия для необъяснимых рецидивирующих самопроизвольных аборт. *Front Immunol.*

- 2022; 13: 813218.
22. Аллан Д. С. Дж., Рыбалов Б., Авонг Г., Зунига-Пфлюкер Дж. К., Копков Х. Д., Карлайл Дж. Р., др. TGF- β влияет на развитие и дифференцировку субпопуляций естественных клеток-киллеров человека. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 2289–95.
 23. Шалмин Ф., Миньо Г., Брушар М., Шеврио А., Вегран Ф., Ишамми А., и др. Транскрипционные факторы Stat3 и Gfi-1 контролируют иммуносупрессивную активность Th17-клеток посредством регуляции экспрессии эктонуклеотидазы. *Иммунитет.* 2012; 36: 362–73.
 24. Шулер П. Дж., Шиллинг Б., Харасимчук М., Хоффманн Т. К., Джонсон Дж., Ланг С., Уайтсайд Т. Л. Фенотипические и функциональные характеристики субпопуляций Т-клеток CD4⁺ CD39⁺ FOXP3⁺ и CD4⁺ CD39⁺ FOXP3^{neg} у онкологических больных. *Eur J Immunol.* 2012; 42: 1876–85.
 25. Эльтцшиг Х. К., Ситковски М. В., Робсон С. К. Пуриnergическая сигнализация во время воспаления. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2322–33.
- References**
1. Malinovskaya EM, Ershova ES, Golimbet VE, Porokhovnik LN, Lyapunova NA, Kutsev SI, et al. Copy Number of Human Ribosomal Genes With Aging: Unchanged Mean, but Narrowed Range and Decreased Variance in Elderly Group. *Front Genet.* 2018; 9: 306. DOI: 10.3389/fgene.2018.00306. PMID: 30131826; PMCID: PMC6090032.
 2. Lyapunova NA, Vejko NN. Ribosomnye geny v genome cheloveka: identifikatsiya chetyrekh fraktsiy, ih lokalizatsiya v yadryshke i metafaznykh hromosomah. *Genetika.* 2010; 46 (9): 1205–9. Russian.
 3. Myao Z, Chen M, U H, Din H, Shi Z. Sravnitel'nyj proteomnyj profil' chelovecheskoj placenty v normal'nom i fetal'nom roste. *Restriktionnye sub"ekty. Cell Physiol Biochem.* 2014; 34: 1701–10.
 4. Tubaon R, Haddad P, Kirino Dzh. Strategii ochistki obrazcov dlya prilozhenij mass-spektrometrii ESI v voskhodyashchej proteomike: Tendencii s 2012 po 2016 god. *Proteomika.* 2017; 17: 1700011.
 5. Horami Sarvestani S, Shodzhayen S, Vanaki N, Gresi-Fard B, Amini M, Dzhilani K, i dr. Proteomnoe profilirovanie chelovecheskoj placenty vyavlyaet izmeneniya v belkovoju signature, zavisyashchie ot stadii razvitiya. *Klinicheskaya proteomika.* 2021; 18: 18.
 6. Braunridzh P, Bejnon R. Vazhnost' dajdzhesta: proteoliz i absolyutnaya kolichestvennaya ocenka v proteomike. *Metody.* 2011; 54: 351–60.
 7. Matthielsen L, Kalkunte S, Sharma S. Multiple pregnancy failures: an immunological paradigm. *Am J Reprod Immunol.* 2012; 67 (4): 334–40.
 8. Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, Shalev E. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and -9) in human trophoblast invasion. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2: 59.
 9. Moore CS, Crocker SJ. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am J Pathol.* 2012; 180: 12–16.
 10. Kizaki K, Ushizawa K, Takahashi T, Yamada O, Todoroki J, Sato T, et al. Gelatinase (MMP-2 and -9) expression profiles during gestation in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 2008; 6: 66.
 11. Seval Y, Akkoyunlu G, Demir R, Asar M. Distribution pattern of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in the human decidua during early pregnancy. *Acta Histochem.* 2004; 5: 353–62.
 12. Diaz P, Solar P, Juica N, Oriuela P, Cardenas H, Christodoulides M, et al. Differential expression of extracellular matrix components in the Fallopian tubes throughout the menstrual cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2012; 10: 56.
 13. Zaga-Clavellina V, Garcia-Lopez G, Flores-Pliego A, Merchant-Larios H, Vadillo-Ortega F. In vitro secretion and activity profiles of matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-2 in human term extra-placental membranes after exposure to *Escherichia coli*. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9: 13–15.
 14. Yusefzade J, Soltani-Zangbar MS, Hemmatzade M, Shomali N, Mahmudpur A, Heris DzhA, et al. Fetomaterinskaya immunnaya tolerantnost': vazhnejshie mekhanizmy tolerantnosti dlya uspešnoy beremennosti u cheloveka. *Immunolog. issledovaniya.* 2022; 51: 1108–25.
 15. Munos-Suano A, Gamilton AB, Betc AG. Dajte mne ubezshishche: immunnaya sistema vo vremya beremennosti. *Immunologicheskij obzor.* 2011; 241: 20–38.
 16. Parhizkar F, Motavalli-Hiavi R, Agebati-Maleki L, Parhizkar Purakbari, Kafil HS, i dr. Vliyanie novykh immunologicheskikh terapevticheskikh strategij na recidiviruyushchie vykidyschi i recidiviruyushchie neudachi implantatsii. *Immunologiya. Pis'ma.* 2021; 236: 20–30.
 17. Parhizkar F, Kiani A, Darzi S, Motavalli R, Dolama FN, Yusefzade Yu, i dr. Ocenka ekspressii CD39, CD73 i HIF-1 α , a takzhe rodstvennykh im mikroRNK v RVMS zhenshchin s privychnym nevynashivaniem beremennosti. *Dzh Reprod Immunol.* 2023; 156: 103820.
 18. Nin F, Lyu H, Lash GE. Rol' decidual'nykh makrofagov vo vremya normal'noj i patologicheskoy beremennosti. *Am J Reprod Immunol.* 2016; 75: 298–309.
 19. Yutel M, Akdis M, Budak F, Ebisher-Kasaulta K, Vzhishch M, Blazer K, i dr. IL-10 i TGF- β vzaimodeystvuyut v oteve regulyatornykh T-kletok na slizistye allergeny pri normal'nom immunitete i specificheskoy immunoterapii. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 1205–14.
 20. Herder K, Zirer A, Kenig V, Roden M, Meizinger K, Torand B. Transformiruyushchij faktor rosta β 1 i vznikovlenie diabeta 2 tipa: rezul'taty kogornogo issledovaniya MONICA/KORA, 1984–2002 gg. *Diabetes Care.* 2009; 32: 1921–23.
 21. Chzhu Dzh, Song G, Chzhou S, Han T-L, Y S, Chen H, i dr. Narushenie regulyatsii metabolizma adenozina CD39/CD73 uvelichivaet citotoksichnost' decidual'nykh estestvennykh kletok-killerov: posledstviya dlya neob'yasnykh recidiviruyushchih samoproizvol'nykh abortov. *Front Immunol.* 2022; 13: 813218.
 22. Allan DSDzh, Rybalov B, Avong G, Zuniga-Pflyuker DzhK, Kopkov HD, Karlajl DzhR, dr. TGF- β vliyaet na razvitie i differencirovku subpopulyacij estestvennykh kletok-killerov cheloveka. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 2289–95.
 23. Shalmin F, Mino G, Brushar M, Shevrio A, Vegrar F, Ishami A, i dr. Transkripcionnye faktory Stat3 i Gfi-1 kontroliruyut immunosuppressivnuyu aktivnost' Th17-kletok posredstvom regulyatsii ekspressii ektonukleotidazy. *Immunitet.* 2012; 36: 362–73.
 24. Shuler P Dzh, Shilling B, Harasimchuk M, Hoffmann TK, Dzhonson Dzh, Lang S, Uajtsajd TL. Fenotipicheskie i funktsional'nye harakteristiki subpopulyacij T-kletok CD4⁺ CD39⁺ FOXP3⁺ i CD4⁺ CD39⁺ FOXP3^{neg} u onkologicheskikh bol'nykh. *Eur J Immunol.* 2012; 42: 1876–85.
 25. Eltchshig HK, Sitkovski MV, Robson SK. Purinergicheskaya signalizatsiya vo vremya vospaleniya. *N Engl J Med.* 2012; 367: 2322–33.

МОЖНО ЛИ ОБНАРУЖИТЬ АУТОХТОННУЮ МИКРОБИОТУ ЭНДОМЕТРИЯ ПРИ ТРАНСЦЕРВИКАЛЬНОМ ВЗЯТИИ ПРОБ?

Д. Л. Зорников¹✉, В. М. Симарзина¹, Д. К. Исламиди^{1,2}, Н. С. Бельх¹, Д. О. Корнилов¹, Е. И. Абакумова², Л. В. Хаяутин², Е. Э. Плотко², Е. С. Ворошилина^{1,2}

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

Трансцервикальный сбор образцов эндометрия традиционно используют для изучения микробиоты полости матки, однако неизбежный риск контаминации цервикальной микробиотой ставит под сомнение происхождение обнаруживаемых микроорганизмов. Цель исследования — определить, можно ли обнаружить аутохтонную микробиоту эндометрия в трансцервикально собранных образцах методом количественной ПЦР с учетом цервикальной контаминации. В одномоментное методологическое исследование включены 185 женщин репродуктивного возраста, у которых проводили забор парных цервикальных и эндометриальных образцов (для эндометриальных образцов использовали зонд Endobrush, Пайпель С2). Микробиоту оценивали методом ПЦР в реальном времени на 27 групп микроорганизмов. Сигнал в эндометрии считали истинным, если его количество превышало таковое в цервикальном образце с учетом порогов переноса 30% (ожидаемый) и 100% (консервативный). Микробные сигналы в эндометрии до поправки обнаружены у 144 (77,8%) пациенток; после поправки положительные сигналы сохранялись у 44,3% (порог 30%) и 37,3% (порог 100%) женщин. Большинство положительных проб на *Lactobacillus* spp. попадали в неинтерпретируемую «серую зону» (47,6 и 55,1% от всех пациенток при порогах 30 и 100% соответственно). Напротив, условно-патогенные микроорганизмы в большинстве случаев оставались истинно положительными после поправок. Аутохтонная микробиота эндометрия обнаруживалась у 37,3% женщин и была представлена 1–3 таксонами, преимущественно не лактобациллами. Таким образом, обнаружение условно-патогенных микроорганизмов в эндометрии можно интерпретировать как маркер их реального присутствия, тогда как лактобациллы в большинстве случаев неотличимы от цервикальной контаминации.

Ключевые слова: микробиота эндометрия, аутохтонная микробиота, цервикальная контаминация, трансцервикальный забор, количественная ПЦР

Благодарности: авторы благодарят генерального директора Медицинского центра «Гармония» (г. Екатеринбург) В. Н. Хаяутину за возможность выполнения исследования на базе центра.

Вклад авторов: Д. Л. Зорников — концепция, анализ, интерпретация и визуализация результатов, подготовка рукописи; В. М. Симарзина — проведение лабораторных исследований, интерпретация результатов, редактирование; Д. К. Исламиди — набор участников исследования, формирование клинических групп, сбор биоматериала, анамнестических и клинических данных, анализ и интерпретация данных, редактирование; Н. С. Бельх — набор участников исследования, сбор биоматериала, анамнестических и клинических данных; Д. О. Корнилов — проведение лабораторных исследований, интерпретация результатов, редактирование; Е. И. Абакумова — набор участников исследования, сбор анамнестических и клинических данных; Л. В. Хаяутин — сбор анамнестических и клинических данных, редактирование; Е. Э. Плотко — организация исследования, редактирование; Е. С. Ворошилина — научное руководство, дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 1 от 24 января 2020 г.; протокол № 4 от 26 мая 2023 г.); информированное согласие на участие в исследовании пациенток получено.

✉ **Для корреспонденции:** Данила Леонидович Зорников
ул. Ключевская, д. 17, г. Екатеринбург, 620109, Россия; zornikovdl@yandex.ru

Статья получена: 28.05.2026 **Статья принята к печати:** 14.06.2026 **Опубликована онлайн:** 05.07.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.039

Авторские права: © 2026 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/>).

CAN AUTOCHTHONOUS ENDOMETRIAL MICROBIOTA BE DETECTED BY TRANSCERVICAL SAMPLING?

Zornikov DL¹✉, Simarzina VM¹, Islamidi DK^{1,2}, Belykh NS², Kornilov DO¹, Abakumova EI², Khayutin LV², Plotko EE², Voroshilina ES^{1,2}

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

Transcervical endometrial sampling is widely used to study the uterine microbiota, but the risk of cervical contamination raises doubts about whether detected microorganisms genuinely originate from the endometrium. This study aimed to determine whether autochthonous endometrial microbiota can be detected in transcervically collected samples by quantitative PCR after accounting for cervical contamination. Paired cervical and endometrial samples were collected from 185 reproductive-age women using an Endobrush catheter for endometrial sampling. Microbiota composition was assessed by real-time PCR targeting 27 microbial groups. An endometrial signal was considered true if its quantity exceeded that in the paired cervical sample, adjusted for transfer thresholds of 30% (expected, based on prior *in vitro* data) and 100% (conservative). Before correction, microbial signals were detected in endometrial samples from 144 (77.8%) women. After correction, positive signals remained in 44.3% (30% threshold) and 37.3% (100% threshold) of women. Most *Lactobacillus* spp. positives fell into an uninterpretable gray zone (47.6% and 55.1% at the 30% and 100% thresholds, respectively). In contrast, opportunistic microorganisms largely remained true positives after correction. Autochthonous endometrial microbiota was detected in approximately 37% of women, typically comprising 1–3 predominantly non-lactobacillus taxa. Detection of opportunistic microorganisms in the endometrium therefore likely reflects their genuine presence, whereas *Lactobacillus* detection is, in most cases, indistinguishable from cervical contamination.

Keywords: endometrial microbiota, autochthonous microbiota, cervical contamination, transcervical sampling, quantitative PCR.

Acknowledgments: the authors thank V. N. Khayutin, General Director of the Harmony Medical Center (Yekaterinburg), for the opportunity to conduct the study at the center.

Author contribution: Zornikov DL — conceptualization, visualization, formal analysis, writing — manuscript preparation; Simarzina VM — laboratory investigations, interpretation of laboratory results, writing — review and editing; Islamidi DK — participant enrollment, formation of clinical groups, collection of biomaterial, anamnestic and clinical data, analysis and interpretation of clinical data, writing — review and editing; Belykh NS — participant enrollment, collection of biomaterial, anamnestic and clinical data; Kornilov DO — laboratory investigations, interpretation of laboratory results, writing — review and editing; Abakumova EI — participant enrollment, collection of anamnestic and clinical data; Khayutin LV — collection of anamnestic and clinical data, writing — review and editing; Plotko EE — project administration, writing — review and editing; Voroshilina ES — supervision, study design, data analysis and interpretation, writing — review and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University (Protocol No. 1 dated January 24, 2020; Protocol No. 4 dated May 26, 2023). Informed consent was obtained from all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Danila L. Zornikov
Klyuchevskaya, 17, Yekaterinburg, 620109, Russia; zornikovdl@gmail.com

Received: 28.05.2026 **Accepted:** 14.06.2026 **Published online:** 05.07.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.039

Copyright: © 2026 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 2015 г. с помощью культурального метода и количественной ПЦР обнаружили микробиоту в полости матки после гистерэктомии [1]. Использование материала после гистерэктомии позволило исключить риск контаминации образцов из полости матки вагинальной и цервикальной микробиотой. Последующее исследование, также проведенное на гистерэктомическом материале, но со строгими отрицательными контролями, убедительно ответило на фундаментальный вопрос, обладает ли полость матки собственной микробиотой, обнаруживаемой молекулярно-генетическими методами [2]. Результатом стало изменение парадигмы о стерильности полости матки: сегодня считается, что в эндометрии существует собственное низкокопийное микробное сообщество. Это сделало изучение микробиоты эндометрия одним из приоритетных направлений в исследованиях микробиома человека [3, 4].

Однако клинические исследования не могут опираться на гистерэктомический материал. Практически все работы, посвященные микробиоте эндометрия и ее связи с репродуктивными исходами, основаны на трансцервикальном заборе проб — часто с использованием зондов типа Пайпель С1 (Пайпель-биопсия) или Пайпель С2 (Эндобраш) [5–13], которые проходят через колонизированный микроорганизмами цервикальный канал. В исследованиях на трансцервикально собранных образцах сообщалось о связи микробиоты эндометрия с невынашиванием беременности [14], хроническим эндометритом [15], полипами эндометрия [5, 16, 17], гиперплазией эндометрия [12], эндометриозом [18]. Однако вопрос о том, действительно ли эти ассоциации отражают изменения именно эндометриальной, а не цервикальной микробиоты, остается открытым. Данная неопределенность вызвана тем, что любой инструмент, проходящий через цервикальный канал, неизбежно несет риск контаминации эндометриального образца цервикальными микроорганизмами.

Это опасение особенно актуально ввиду того, что бактериальная нагрузка в полости матки может быть существенно ниже, чем в цервикальном канале [19]. В этом случае даже незначительная контаминация может замаскировать любой истинный эндометриальный сигнал или, наоборот, контаминация цервикальными микроорганизмами может быть интерпретирована как наличие данных микроорганизмов в полости матки. В большинстве опубликованных исследований авторы пытаются снизить этот риск с помощью предварительной обработки влагалища и цервикса физиологическим раствором или антисептиками, а также используют сравнение микробиоты эндометрия с микробиотой влагалища или цервикального канала в качестве контроля [5–10, 12, 13, 15–17, 20, 21]. Однако это не позволяет полностью исключить риск контаминации и достоверно оценить ее наличие.

В недавнем исследовании с помощью *in vitro* модели цервикального канала мы провели экспериментальную количественную оценку уровня контаминации образцов цервикальной микробиотой при использовании зондов Пайпель С1 и С2 [22]. Было продемонстрировано, что и зонды Пайпель С1, и зонды Пайпель С2 переносят значительное количество микробиоты из цервикальной слизи в модельные эндометриальные образцы — медианный перенос составил 81,6% для С1 и 29,8% для С2. Эти результаты поставили под сомнение происхождение микробиоты, обнаруживаемой в трансцервикально

собранных образцах эндометрия. Однако *in vitro* модели не могут полностью воспроизвести сложность клинических условий, и истинная степень контаминации в реальных образцах пациенток остается неизвестной.

Это подводит нас к вопросу: можно ли обнаружить аутохтонную микробиоту эндометрия в трансцервикально собранных образцах? Иными словами, сохраняется ли истинный эндометриальный микробный сигнал — продемонстрированный на гистерэктомическом материале [1, 2] — при прохождении через неизбежную «контаминационную завесу» цервикальной микробиоты во время реального клинического забора? В настоящем исследовании мы определяем эндометриальный сигнал как «аутохтонный» (истинный) только в том случае, если концентрация бактериальной ДНК в эндометриальном образце превышает уровень, который может быть объяснен цервикальным переносом.

Цель исследования — определить, можно ли обнаружить аутохтонную микробиоту эндометрия в трансцервикально собранных образцах методом количественной ПЦР с учетом цервикальной контаминации.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Пациенты

В исследовании приняли участие 185 женщин репродуктивного возраста (медиана — 32,9, Q_1 – Q_3 [29,9–37] лет). Все пациентки проходили обследование в связи с нарушением репродуктивной функции в анамнезе либо с подозрением на патологию эндометрия в медицинском центре «Гармония» (г. Екатеринбург) в период с января 2020 по август 2023 г.

Критерии включения в исследование: репродуктивный возраст (18–45 лет); интервальный период (вне беременности); сохраненный менструальный цикл; наличие клинических или ультразвуковых признаков патологии эндометрия либо бесплодие; возможность одномоментного получения парных клинических образцов (цервикального содержимого и образца эндометрия); согласие пациенток на участие в исследовании.

Критерии невключения: гормональная и внутриматочная контрацепция на момент обследования и в течение предшествующих 6 месяцев; онкологические заболевания любой локализации; острые воспалительные заболевания нижних отделов репродуктивного тракта и органов малого таза на момент обследования; антибактериальная терапия в течение четырех недель до обследования; отказ от участия в исследовании.

Критерии исключения: наличие инфекций, передаваемых половым путем, вызванных облигатными патогенами — *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* (ранее *Mycoplasma genitalium*), *Trichomonas vaginalis* — по результатам теста Андрофлор («ДНК-технология», Россия).

Для оценки микробиоты в цервикальном и эндометриальном образцах проводили ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на 27 групп микроорганизмов.

Сбор образцов

Исследование проводили на 8–12-й день менструального цикла. Для минимизации риска контаминации образцы брали в восходящем порядке (влагалище → цервикальный канал → полость матки).

Вагинальный образец

Вагинальный образец брали из задне-бокового свода влагалища до обработки антисептиком с помощью стерильного одноразового урогенитального зонда типа А-2. Биоматериал переносили в пробирку типа Эппендорф, содержащую стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl). В настоящем исследовании вагинальные образцы не анализировали.

Обработка влагалища

После взятия вагинального образца проводили обработку влагалища кавитированным низкочастотным ультразвуком 0,05%-м раствором хлоргексидина биглюконата с помощью аппарата АУЗХ-100 («Фотек», Россия) в соответствии с руководством [23]: время воздействия — 1–2 мин, мощность — 6–8 единиц, объем используемого раствора — 150–200 мл. Данная процедура служила мерой профилактики инфекционно-воспалительных осложнений перед последующим взятием материала из полости матки [24].

Цервикальный образец

После обработки влагалища брали образец цервикальной слизи новым стерильным зондом типа А-2, вводя его в цервикальный канал на глубину 1–1,5 см. Биоматериал переносили в пробирку типа Эппендорф, содержащую стерильный физиологический раствор.

Эндометриальный образец

Для взятия образца из полости матки использовали устройство Endobrush Standard for Endometrial Cytology (Laboratoire C.C.D., Франция) — зонд типа С «Пайпель», модель 2 (Пайпель С2). Устройство снабжено защитным проводником, который предохраняет расположенную внутри щетку от контакта со слизистой цервикального канала: щетка раскрывается только после введения в полость матки, а перед извлечением задвигается внутрь проводника. Предварительно шейку матки выводили в зеркалах, повторно очищали тампоном, смоченным 0,05%-м раствором хлоргексидина, затем вводили устройство в полость матки трансцервикально, не касаясь стенок влагалища. После достижения полости матки защитный проводник отодвигали, обнажая щетку, и выполняли 3–5 вращательных движений для сбора биоматериала. Затем щетку втягивали обратно в защитный проводник и извлекали устройство. Наружную поверхность проводника тщательно протирали стерильным тампоном, смоченным 96%-м этиловым спиртом, для удаления остатков цервикальной слизи и предотвращения контаминации пробы. После этого щетку выдвигали и переносили биоматериал в пробирку, содержащую стерильный физиологический раствор.

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали набор «Проба-НК-ПЛЮС» («ДНК-технология», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Образцы эндометрия подвергали предварительной депротеинизации: пробирки с образцом эндометрия центрифугировали 10 мин при 13 000 об./мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf,

Германия), удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 100 мкл лизирующего раствора из набора «Проба-НК-ПЛЮС» и тщательно перемешивали на вортексе до гомогенного состояния. Затем 50 мкл полученного гомогенизата переносили в чистую пробирку, содержащую смесь из 25 мкл лизирующего раствора, 5 мкл протеиназы К (20 мг/мл; WVR Life Science, США) и 120 мкл стерильного физиологического раствора. После перемешивания образцы инкубировали при 60 °C в течение 30 мин, затем при 95 °C в течение 10 мин. По окончании инкубации пробирки центрифугировали 60 с при 13 000 об./мин. Надосадочную жидкость в объеме 100 мкл использовали для выделения ДНК согласно инструкции набора «Проба-НК-ПЛЮС». Необходимость предварительной депротеинизации эндометриальных образцов была обусловлена их высокой вязкостью, связанной с присутствием большого количества белка и слизи, что могло снижать эффективность экстракции ДНК. Цервикальные образцы не требовали данной стадии ввиду иной консистенции материала. Отрицательные контроли (стерильный физиологический раствор) включали в каждую постановку выделения ДНК и ПЦР для исключения реагентной контаминации.

Исследование микрофлоры

В каждом образце методом ПЦР-РВ оценивали количества 27 групп микроорганизмов: *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus vaginalis*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp. (группа MVD), *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp. (группа SLF), *Atopobium* cluster, *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp. (группа BPP), *Anaerococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp. (группа PP), *Eubacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia* spp. / *Burkholderia* spp. (группа PRB), *Enterobacteriaceae* / *Enterococcus* spp., *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Metamycoplasma hominis*, *Candida* spp.

ПЦР-РВ проводили с помощью набора «Андрофлор» и набора для видовой оценки вагинальных лактобацилл (оба производства «ДНК-технология», Россия) на амплификаторах «ДТ-Прайм» и «ДТ-96» с использованием штатного программного обеспечения и программ амплификации к наборам («ДНК-технология», Россия). В соответствии с инструкциями к используемым наборам, пробы по группам *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Metamycoplasma hominis* считали положительными при любом отличном от нуля количестве, для остальных групп микроорганизмов минимальным порогом обнаружения было количество в 10^3 геном-эквивалентов на образец (ГЭ/образец).

Статистический анализ

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили в среде R версия 4.6.0 (R Foundation for Statistical Computing; Вена, Австрия). В качестве меры центральной тенденции при описании переменных указывали медиану со значениями 1-го и 3-го квартилей (Q_1 и Q_3). Статистическую значимость различий между частотными показателями оценивали двусторонним точным тестом

Таблица 1. Клиническая характеристика пациенток

Параметр	Значение
Возраст, лет	32,9 (29,9–37)
Индекс массы тела, кг/м ²	22,1 (20,2–24,4)
Акушерско-гинекологический анамнез	
Возраст менархе, лет	13 (12–14)
Длительность менструального цикла, дни	29 (28–30)
Продолжительность менструаций, дни	5 (5–7)
Всего беременностей	1 (0–2)
Паритет (роды)	78 (42,4%)
Аборты в анамнезе	44 (23,8%)
Потери беременности в анамнезе	40 (21,6%)
Акушерско-гинекологическая патология*	
Бесплодие	77 (41,6%)
Эндометриоз	32 (17,3%)
Миома матки	17 (9,2%)
Гиперплазия эндометрия	13 (7%)
Воспалительные заболевания органов малого таза	10 (5,4%)
ВПЧ-носительство	7 (3,8%)
Гиперпролактинемия	7 (3,8%)
Невынашивание беременности	6 (3,2%)
Обильные маточные кровотечения	6 (3,2%)
Хронический цервицит	6 (3,2%)
Дисплазия шейки матки	4 (2,2%)
Полип эндометрия	4 (2,2%)
Синдром поликистозных яичников	2 (1,1%)
Тератома	1 (0,5%)
Хронический эндометрит	1 (0,5%)
Нет патологии в анамнезе	17 (9,2%)

Примечание: * — сумма по акушерско-гинекологической патологии превышает 100%, так как у ряда пациенток имелось более одного диагноза.

Фишера, между количественными показателями — тестом Манна-Уитни. Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика пациенток

На момент исследования пациентки предъявляли жалобы на изменение характера менструаций, имели ультразвуковые признаки патологии эндометрия либо проходили обследование по поводу бесплодия. Данные состояния служили показанием для обследования, в том числе взятия материала из полости матки для исследования микробиоты. Большинство пациенток в анамнезе имели акушерско-гинекологическую патологию; у 17 (9,2%) женщин анамнез был не отягощен (табл. 1).

Сравнение микробиоты в цервикальных и эндометриальных образцах

Микробные сигналы из образцов эндометрия обнаруживали у 144 (77,8%) пациенток. Для большинства групп микроорганизмов частота обнаружения в цервикальных образцах в 1,3–3 раза превышала таковую для образцов эндометрия (рис. 1). В том числе статистически значимо чаще в цервикальных образцах выявляли группы: *Lactobacillus* spp. (88,6 против 68,1%),

L. crispatus (39,5 против 15,7%), *L. iners* (41,6 против 28,1%), *L. jensenii* (31,9 против 10,8%), *L. gasseri* (16,8 против 8,1%), *L. johnsonii* (3,2 против 0%), *L. vaginalis* (23,8 против 2,7%), *Anaerococcus* spp. (10,8 против 2,2%), *Eubacterium* spp. (31,9 против 20%), *Enterobacteriaceae/Enterococcus* spp. (13 против 5,9%), *U. parvum* (6,5 против 0%).

Статистически значимые различия в количествах микроорганизмов между цервикальными и эндометриальными образцами обнаружили для 13 групп микроорганизмов: *Lactobacillus* spp., *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. vaginalis*, *G. vaginalis*, *Anaerococcus* spp., группа PP, *Eubacterium* spp., *Enterobacteriaceae/Enterococcus* spp., *U. parvum* (рис. 1). Наибольшие количества в обоих биотопах были характерны для *Lactobacillus* spp.: $10^{4,9}$ ($10^{3,8}$ – $10^{6,1}$) ГЭ/образец в цервикальных пробах против $10^{3,5}$ (0 – $10^{4,2}$) ГЭ/образец в пробах эндометрия ($p < 0,001$). Медианные количества остальных групп микроорганизмов в обоих биотопах равнялись нулю; статистически значимые различия при этом были обусловлены более высокими концентрациями в верхних квартилях распределения цервикальных образцов.

Эндометриальные сигналы после поправки на возможную контаминацию

Для каждого положительного сигнала в образце эндометрия рассчитывали отношение количества микроорганизма в эндометрии к его количеству в цервикальном образце той

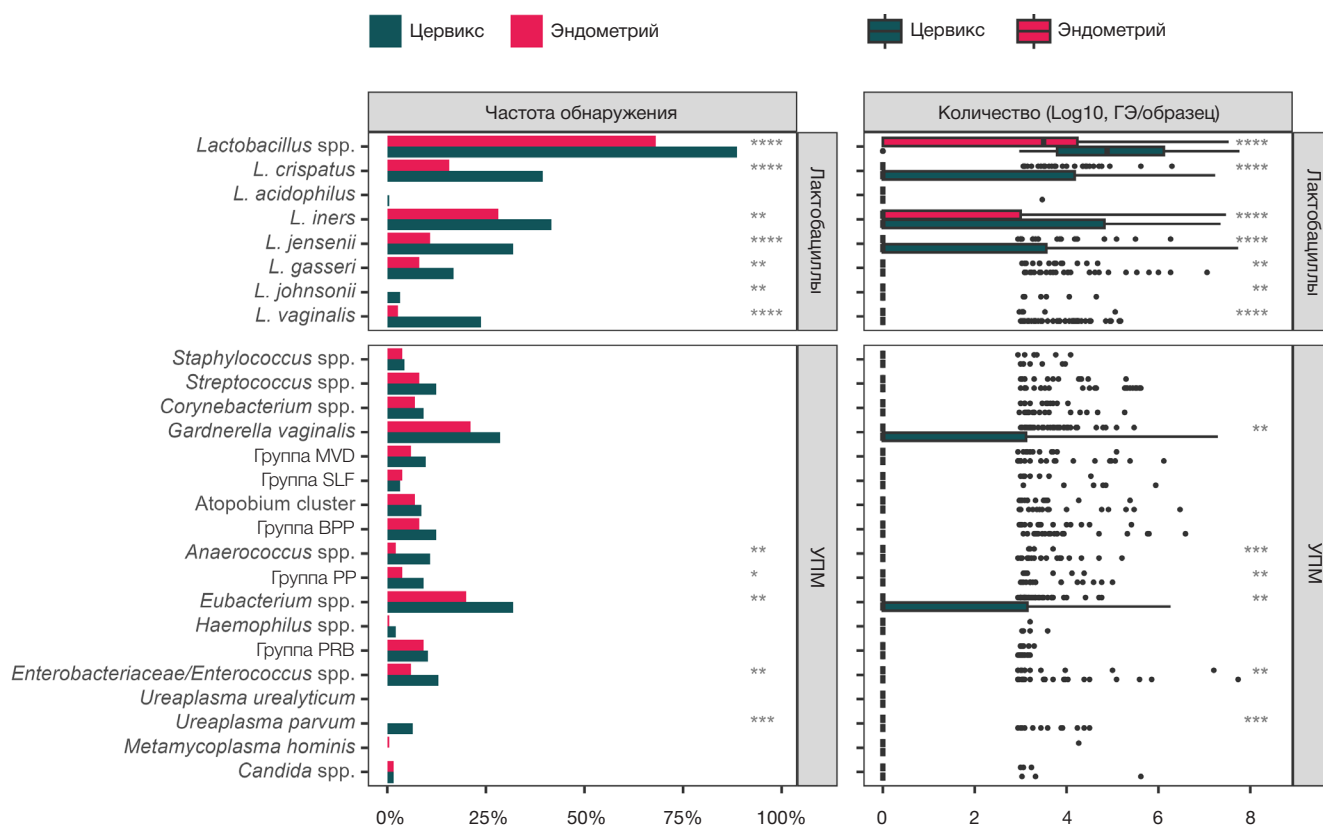


Рис. 1. Микробиота цервикальных и эндометриальных образцов. Частота обнаружения (левая панель) и количества (правая панель) целевых групп микроорганизмов. УПМ — условно-патогенные микроорганизмы; MVD — *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp.; SLF — *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp.; BPP — *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp.; PP — *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp.; PRB — *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia* spp. / *Burkholderia* spp. Уровни статистической значимости: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$

же пациентки. Сигнал считали истинно эндометриальным, если это отношение превышало допущенный уровень цервикального переноса. В качестве допустимого цервикального переноса принимали 30% (ожидаемый порог — по результатам предыдущего *in vitro* эксперимента [22]) и 100% (консервативный порог — количество микроорганизма в эндометрии превышает таковое в цервиксе). При отсутствии целевого микроорганизма в

цервикальном образце любой положительный сигнал в эндометрии считали превышающим порог переноса, поскольку он не может быть объяснен цервикальной контаминацией.

После применения указанных порогов микроорганизмы обнаруживали в 82 (44,3%) пробах (порог — 30%) и в 69 (37,3%) пробах (порог — 100%) (рис. 2). В большинстве положительных проб обнаруживали не более трех групп



Рис. 2. Образцы с микробиотой эндометриального происхождения при допущении 30% (левая панель) и 100% (правая панель) переноса цервикальной микробной ДНК. О наличии микробиоты в образце эндометрия судили при наличии хотя бы одной целевой группы микроорганизмов в количестве выше допущенного уровня переноса

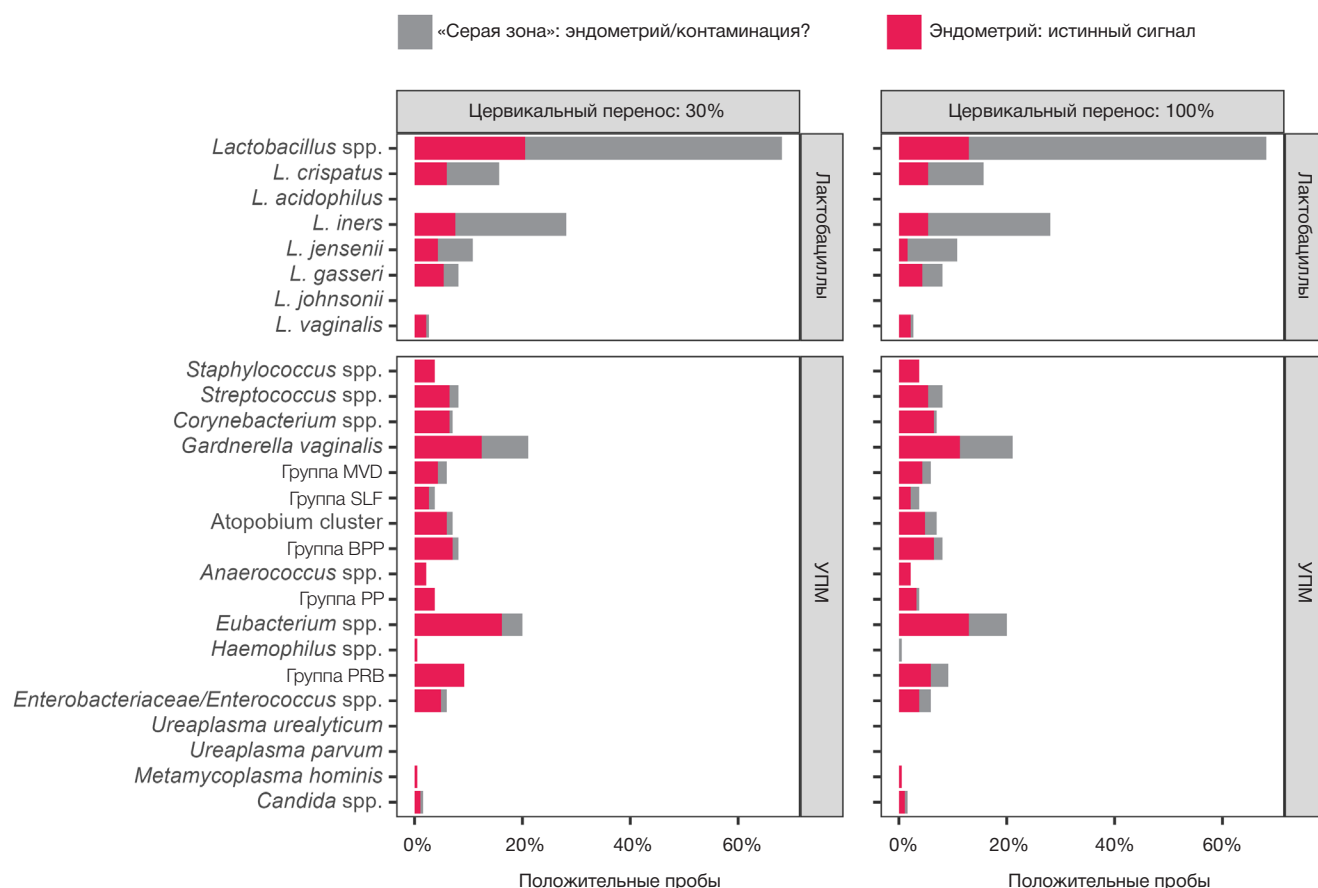


Рис. 3. Частота обнаружения целевых групп микроорганизмов в пробах эндометрия после поправок на возможный перенос 30% (левая панель) и 100% (правая панель) цервикальной ДНК матрицы. УПМ — условно-патогенные микроорганизмы; MVD — *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp.; SLF — *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp.; BPP — *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp.; PP — *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp.; PRB — *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia* spp. / *Burkholderia* spp.

микроорганизмов. При пороге в 30% выявляли одну группу — в 31 (16,8%), две группы — в 13 (7%), три группы — в 15 (8,1%) случаях; при пороге в 100% выявляли одну группу — в 28 (15,1%), две группы — в 12 (6,5%), три группы — в 12 (6,5%) случаях. В единичных образцах присутствовали до 11 групп микроорганизмов при пороге 30% и до 10 групп при пороге 100%.

Далее оценивали частоту обнаружения каждой группы микроорганизмов в образцах эндометрия после применения поправки на возможную контаминацию цервикальной микрофлорой. В зависимости от результата каждую пробу относили к одной из трех категорий: отрицательный результат (сигнал отсутствует), «серая зона» (сигнал обнаружен, но не превышает установленного порога переноса), истинный эндометриальный сигнал (превышает порог и не может быть объяснен только контаминацией) (рис. 3):

$$x = \frac{\text{Количество целевого МО}_{(\text{полость матки})}}{\text{Количество целевого МО}_{(\text{цервикальный канал})} \times \text{Порог переноса}}$$

где $x > 1$ — истинный сигнал, $x \leq 1$ — «серая зона». В качестве порога переноса принимали 0,3 (30% переноса) и 1 (100% переноса).

При пороге переноса 30% в «серую зону» попадали 88 (47,6% от всех анализируемых пациенток) проб на *Lactobacillus* spp., 18 (9,7%) — на *L. crispatus*, 38 (20,5%) — на *L. iners*, 12 (6,5%) — на *L. jensenii* и 1 (0,5%) — на *L. vaginalis*. Для условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) наибольшее количество проб в «серой зоне» отмечали

для *G. vaginalis* и *Eubacterium* spp. — 16 (8,6%) и 7 (3,8%) соответственно. Для остальных УПМ в «серую зону» попадали 0–1,6% проб.

При пороге переноса 100% в «серую зону» попадали 102 (55,1% от всех анализируемых пациенток) проб на *Lactobacillus* spp., 19 (10,3%) — на *L. crispatus*, 42 (22,7%) — на *L. iners*, 17 (9,2%) — на *L. jensenii* и 1 (0,5%) — на *L. vaginalis*. Для УПМ наибольшее количество проб в «серой зоне» отмечали для *G. vaginalis* и *Eubacterium* spp. — 18 (9,7%) и 13 (7%) соответственно. Для остальных УПМ в «серую зону» попадали 0–3,2% проб.

После применения поправки частота наиболее представленной группы *Lactobacillus* spp. снизилась с 126 (68,1%, до поправки) до 38 (20,5%, 30% порог) и 24 (13%, 100% порог). Отдельные виды лактобацилл и группы УПМ после применения поправок обнаруживали в 0,5–16,2% случаев при 30% пороге и в 0,5–13% при 100% пороге; сигналы по *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *U. urealyticum*, *U. parvum* отсутствовали в образцах эндометрия после коррекции вне зависимости от использованного порога (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В образцах эндометрия исследованных пациенток выявили 22 из 27 целевых групп микроорганизмов (рис. 1). *Lactobacillus* spp. обнаружили в 68,1% проб с медианным количеством $10^{3.5}$ ГЭ/образец, тогда как остальные группы идентифицировали менее чем у трети пациенток, что согласуется с известными данными о

Таблица 2. Частота обнаружения микроорганизмов в образцах эндометрия после применения поправок на возможную контаминацию. Микроорганизмы ранжированы по частоте обнаружения при пороге в 30%

Группа микроорганизмов	Частота при пороге 30%	Частота при пороге 100%
<i>Lactobacillus</i> spp.	38 (20,5%)	24 (13%)
<i>Eubacterium</i> spp.	30 (16,2%)	24 (13%)
<i>Gardnerella vaginalis</i>	23 (12,4%)	21 (11,4%)
Группа PRB	17 (9,2%)	11 (5,9%)
<i>L. iners</i>	14 (7,6%)	10 (5,4%)
Группа BPP	13 (7%)	12 (6,5%)
<i>Streptococcus</i> spp.	12 (6,5%)	12 (6,5%)
<i>Corynebacterium</i> spp.	12 (6,5%)	10 (5,4%)
<i>L. crispatus</i>	11 (5,9%)	10 (5,4%)
<i>L. gasseri</i>	11 (5,9%)	9 (4,9%)
<i>Atopobium cluster</i>	10 (5,4%)	8 (4,3%)
<i>Enterobacteriaceae/Enterococcus</i> spp.	9 (4,9%)	7 (3,8%)
<i>L. jensenii</i>	8 (4,3%)	3 (1,6%)
Группа MVD	8 (4,3%)	8 (4,3%)
Группа PP	7 (3,8%)	6 (3,2%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	7 (3,8%)	7 (3,8%)
Группа SLF	5 (2,7%)	4 (2,2%)
<i>L. vaginalis</i>	4 (2,2%)	4 (2,2%)
<i>Anaerococcus</i> spp.	4 (2,2%)	4 (2,2%)
<i>Candida</i> spp.	2 (1,1%)	2 (1,1%)
<i>Haemophilus</i> spp.	1 (0,5%)	0 (0%)
<i>Metamycoplasma hominis</i>	1 (0,5%)	1 (0,5%)
<i>L. acidophilus</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>L. johnsonii</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>Ureaplasma parvum</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	0 (0%)	0 (0%)

Примечание: PRB — *Pseudomonas aeruginosa* / *Ralstonia* spp./ *Burkholderia* spp. BPP — *Bacteroides* spp. / *Porphyromonas* spp. / *Prevotella* spp.; MVD — *Megasphaera* spp. / *Veillonella* spp. / *Dialister* spp.; PP — *Peptostreptococcus* spp. / *Parvimonas* spp.; SLF — *Sneathia* spp. / *Leptotrichia* spp. / *Fusobacterium* spp.

низком альфа-разнообразии и копийности микробиоты эндометрия [1, 2, 21]. Значения частоты обнаружения всех 22 групп были выше в цервикальных образцах, чем в образцах эндометрия. Так, *Lactobacillus* spp. выявляли в 88,6% цервикальных образцов с медианным количеством $10^{4,9}$ ГЭ/образец ($p < 0,0001$ как для частоты, так и для количества). Данное наблюдение в сочетании с ранее полученным *in vitro* результатом о 30%-м переносе бактериальной ДНК из цервикальной слизи в пробу эндометрия при использовании зонда Пайпель C2 [22] указывает на то, что часть положительных сигналов в образцах эндометрия может быть обусловлена цервикальной контаминацией.

Для дифференцирования истинно эндометриальных сигналов от цервикальной контаминации мы сравнили количество ДНК каждого микроорганизма в эндометриальном образце с его количеством в цервикальном образце той же пациентки. Использовали два порога допустимого переноса: 30% (ожидаемый, основанный на *in vitro* эксперименте [22]) и 100% (консервативный, при котором количество микроорганизма в эндометрии превышает его количество в цервиксе и не может быть объяснено контаминацией). При обоих порогах более половины образцов эндометрия не содержали положительных сигналов в надпороговых значениях (рис. 2), что не позволяет рассматривать эти пробы как истинно положительные — присутствие микроорганизмов

в них могло быть полностью объяснено цервикальным переносом. Среди положительных проб (44,3% при пороге 30%, 37,3% при пороге 100%) большинство содержали не более 3 групп микроорганизмов. Таким образом, после применения поправки на контаминацию из 144 (77,8%) изначально положительных проб эндометрия почти половина были переклассифицированы как неинтерпретируемые, а в сохранившихся положительных пробах присутствовали единичные таксоны.

Следующим шагом мы оценили результаты по каждой целевой группе микроорганизмов с учетом введенных поправок на возможную контаминацию. В зависимости от результата каждую пробу относили к одной из трех категорий: отрицательный результат (сигнал отсутствует), «серая зона» (сигнал обнаружен, но не превышает установленного порога переноса), истинный эндометриальный сигнал (превышает порог и не может быть объяснен только контаминацией). Для *Lactobacillus* spp. и отдельных видов лактобацилл большинство проб — от 2/3 до 3/4 изначально положительных — попадали в «серую зону» (рис. 3). Так, до поправки *Lactobacillus* spp. выявили у 126 (68,1%) пациенток; после применения порога 30% — у 38 (20,5%), порога 100% — у 24 (13%). Аналогичные паттерны наблюдали для трех основных видов лактобацилл — *L. crispatus*, *L. iners* и *L. jensenii*. Для УПМ доля проб, попадавших в «серую зону», была ниже, чем для лактобацилл: 8,6 и 9,7% для *G. vaginalis*,

3,8 и 7% для *Eubacterium* spp. при порогах 30 и 100% соответственно; для остальных УПМ — 0–1,6% и 0–3,2%. Таким образом, среди положительных проб на УПМ большинство оставались истинно положительными и после применения поправок, хотя частота их обнаружения не превышала 16,2% при пороге 30% и 13% при пороге 100%.

Полученные результаты согласуются с осторожной позицией авторов исследования [2], предположивших, что преобладание лактобацилл в микробиоте трансцервикально собранных проб эндометрия [5, 18, 25–27] может быть обусловлено цервикальной или вагинальной контаминацией. В пользу этого предположения свидетельствуют и более ранние культуральные исследования, продемонстрировавшие более высокую частоту выделения бактерий из образцов эндометрия, полученных трансцервикально, по сравнению с трансабдоминальным доступом [28]. В нашем исследовании мы напрямую оценили вклад цервикальной контаминации при трансцервикальном заборе: использование парных цервикальных образцов и пороговой модели переноса ДНК продемонстрировало, что цервикальная контаминация способна объяснить большинство положительных сигналов в эндометрии. Тот факт, что *Lactobacillus* spp. в данной работе демонстрировал наибольшую долю проб в «серой зоне», подтверждает высказанное Winters и соавторами предположение о том, что *Lactobacillus*-доминирование эндометрия может быть артефактом забора материала [2]. Более того, после введенных поправок на возможную контаминацию *G. vaginalis* и *Eubacterium* spp. оказались самыми часто встречающимися микроорганизмами в образцах эндометрия наряду с *Lactobacillus* spp. и опережали все отдельные виды лактобацилл (табл. 2).

Обнаружение целевого микроорганизма в эндометрии в количествах выше установленного порога цервикального переноса не является абсолютным доказательством его эндометриального происхождения, однако с высокой вероятностью отражает истинное присутствие микроорганизма в полости матки, поскольку такой сигнал не может быть объяснен цервикальной контаминацией в рамках использованной модели. В настоящем исследовании у 37,3% пациенток микробные сигналы в образцах эндометрия сохранялись даже при консервативном пороге 100%, что не может быть полностью объяснено цервикальной контаминацией и указывает на присутствие аутохтонной микробиоты эндометрия. Однако в большинстве случаев она была представлена 1–3 группами нелактобациллярных микроорганизмов, а частота обнаружения самой распространенной группы не превышала 13%.

Преимущественное попадание лактобацилл в «серую зону» не обязательно означает их отсутствие в эндометрии. Не исключено, что в части проб лактобациллы присутствовали, но в количествах, недостаточных для уверенного отличия от цервикального переноса. Анатомическая близость шейки и полости матки может обуславливать объективное сходство микробных сообществ этих биотопов. Показательно, что при использовании материала после гистерэктомии и секвенирования гена 16S рПНК не было выявлено значимых различий между микробиотой цервикса и эндометрия [2].

Примечательно, что большинство УПМ, обнаруженных в эндометрии, сохранялись в качестве истинно положительных сигналов даже после применения консервативного порога контаминации 100% (рис. 3). Причины данного явления остаются неясными, однако этот факт имеет практическое значение. В отличие от

лактобацилл, которые в большинстве случаев попадали в «серую зону», детекция УПМ в образце эндометрия с высокой вероятностью отражает их действительное присутствие в полости матки, а не артефакт забора материала. Это особенно важно в клиническом контексте, поскольку именно УПМ традиционно ассоциируются с патологией эндометрия и являются основной целью микробиологического исследования образцов из полости матки.

Сильной стороной настоящего исследования является дизайн с парными образцами (цервикс–эндометрий), полученными от одной пациентки в ходе одной процедуры. Такой подход позволил использовать индивидуальный уровень цервикальной микробной нагрузки в качестве референсного для оценки контаминации, а не полагаться на усредненные групповые значения, что полностью исключает влияние клинической разнородности пациенток на оценку контаминации. Использование двух порогов переноса — 30% (ожидаемый, основанный на *in vitro* модели [22]) и 100% (консервативный, полностью исключающий возможность контаминации) — позволило оценить устойчивость полученных результатов к выбору порога. Применение количественной ПЦР с детекцией 27 групп микроорганизмов обеспечило высокую аналитическую чувствительность и позволило оценить как частоту, так и абсолютное количество каждой целевой группы микроорганизмов, что выгодно отличает данную работу от исследований, основанных исключительно на секвенировании гена 16S рПНК.

Практическим следствием полученных результатов является необходимость пересмотра подходов к исследованию микробиоты эндометрия. Использование зондов с защитным проводником (Пайпель С2), даже в сочетании с антисептической обработкой, не позволяет надежно дифференцировать эндометриальные и цервикальные микроорганизмы. В краткосрочной перспективе целесообразным представляется изучение совокупной цервикс-эндометриальной микробиоты в общем образце, полученном при трансцервикальном заборе, — такой подход, по крайней мере, не создает иллюзии селективного исследования эндометрия. В долгосрочной перспективе необходима разработка методов, позволяющих минимизировать цервикальную контаминацию.

Ограничения исследования

Настоящее исследование имеет ряд ограничений. Во-первых, модель контаминации предполагала, что единственный цервикальный образец адекватно отражает микробную нагрузку по всей длине цервикального канала; однако возможна региональная вариабельность концентрации микроорганизмов, что могло приводить к недооценке или переоценке уровня переноса. Во-вторых, протокол выделения ДНК различался для цервикальных и эндометриальных образцов: эндометриальные пробы подвергались предварительной депротеинизации, что могло повлиять на эффективность экстракции ДНК и соотношение количеств микроорганизмов между биотопами. В-третьих, использованные ПЦР-панели были ограничены 27 целевыми группами микроорганизмов; в отличие от секвенирования гена 16S рПНК, такой подход не позволяет оценить полный таксономический состав микробиоты и выявить микроорганизмы, не включенные в панели. В-четвертых, количественная ПЦР не позволяет отличить живые микроорганизмы от внеклеточной

ДНК, поэтому часть детектируемых сигналов могла быть обусловлена нежизнеспособными бактериями или свободной ДНК, попавшей в полость матки из нижних отделов репродуктивного тракта, что должно учитываться при клинической интерпретации результатов. В-пятых, вагинальные образцы были собраны, но не проанализированы в рамках настоящей работы. Хотя риск контаминации эндометрия влагалищной микробиотой считается низким при визуальном контроле введения зонда, отсутствие этих данных ограничивает возможность оценки полного континуума микробных сообществ нижних отделов репродуктивного тракта. Наконец, исследование выполнено в одном центре, и его результаты требуют независимого воспроизведения.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование демонстрирует, что трансцервикальное взятие эндометрия с помощью зондов Пайпель C2 (Эндобраш) не позволяет надежно

отличить эндометриальную микробиоту от цервикальной у большинства пациенток. Истинные эндометриальные сигналы методом количественной ПЦР обнаруживали примерно у 40% женщин и, как правило, всего по 1–3 таксонам. Большая часть положительных эндометриальных проб на лактобациллы (например, около 2/3 от изначально положительных на *Lactobacillus* spp.) попадала в «серую зону» и могла быть обусловлена как присутствием микроорганизмов в эндометрии, так и контаминацией образца цервикальной микробиотой. Напротив, обнаружение УПМ в эндометрии можно интерпретировать как маркер их реального присутствия, поскольку их количества в большинстве случаев превышали установленные пороги цервикального переноса. Полученные результаты указывают на необходимость разработки новых методов взятия образцов эндометрия, позволяющих эффективно исключать контаминацию цервикальной микробиотой, либо интерпретировать результаты исследования такого биоматериала как совокупную цервико-эндометриальную микробиоту.

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. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 212 (5): 611–e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.11.043>.
- 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? *Scientific Reports*. 2019; 9: 9905. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46173-0>.
- Polifke A, Schwedler A von, Gulba R, Bensmann R, Diltthey A, Nassar NN, et al. Differential characteristics of vaginal versus endometrial microbiota in IVF patients. *Scientific Reports*. 2024; 14 (1): 1–16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82466-9>.
- Franasiak JM, Scott RT. Endometrial microbiome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2017; 29 (3): 146–52. Available from: <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000357>.
- Fang RL, Chen LX, Shu WS, Yao SZ, Wang SW, Chen YQ. Barcoded sequencing reveals diverse intrauterine microbiomes in patients suffering with endometrial polyps. *American journal of translational research*. 2016; 8 (3): 1581.
- 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. *PeerJ*. 2016; 4: e1602. Available from: <https://doi.org/10.7717/peerj.1602>.
- Курцер М. А., Егикян Н. М., Савельева Н. А., Сеницына О. В., Ватагина М. А., Кутакова Ю. Ю. Сравнительная характеристика вагинального и эндометриального микробиома у пациенток со вторичным бесплодием, ассоциированным с нишей рубца на матке после кесарева сечения. *Гинекология*. 2021; 23 (6): 499–503. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.26442/20795696.2021.6.201300>.
- Карахалис Л. Ю., Кононенко Т. С. Таксономический профиль микробиома эндометрия при хроническом эндометрите. *Акушерство и гинекология: Новости Мнения Обучения*. 2022; 10 (4): 23–30. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.33029/2303-9698-2022-10-4-23-30>.
- Bui BN, Hoogenhuijze N van, Viveen M, Mol F, Teklenburg G, Bruin JP de, 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. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30591-2>.
- Jain M, Mladova E, Dobychina A, Kirilova 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): 310–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/19396368.2023.2195040>.
- Masucci L, D'Ippolito S, De Maio F, Quaranta G, Mazzarella R, Bianco DM, et al. Celiac disease predisposition and genital tract microbiota in women affected by recurrent pregnancy loss. *Nutrients*. 2023; 15 (1): 221.
- Ying X, Xu G, Wang H, Wang Y. An altered uterine microbiota with endometrial hyperplasia. *BMC microbiology*. 2024; 24 (1): 258. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03379-1>.
- Крысанова А. А., Сторожева К. В., Будилковская О. В., Хуснутдинова Т. А., Шалепов К. В., Тапильская Н. И., и др. Архитектоника микробиоты эндометрия у женщин с бесплодием различного генеза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (9): 478–86. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-9-478-486>.
- Moreno I, Garcia-Grau I, Bau D, Perez-Villaroya D, Gonzalez-Monfort M, Vilella F, et al. The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2020; 222 (4): 296–305. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.01.031>.
- 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. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2024; 23: 49. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00710-6>.
- Zhao Y, Liao Y, Xu G, Wang Y. Endometrial microbiota alteration in female patients with endometrial polyps based on 16S rRNA gene sequencing analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2024; 14: 1351329. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1351329>.
- 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. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2025.007>.
- Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016; 199: 69–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.01.040>.
- 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. *Nature Communications*. 2017; 8: 875. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>.
20. 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. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020; 10: 350. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00350>.
 21. Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Колосова 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. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.24075/brsmu.2020.012>.
 22. Зорников Д. Л., Бехтер А. А., Корнилов Д. О., Симарзина В. М., Нечаева Д. М., Карякина А. Е., и др. Урогенитальные зонды типа Пайпель-С не предотвращают контаминацию эндометриальных образцов цервикальной микробиотой. *Вестник РГМУ*. 2025; 6: 95–102. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2025.073>.
 23. Обоскалова Т., Глухов Е., Лаврентьева И., Богданова А., Козырева Е., Нефф Е., и др. Профилактика и лечение воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии с использованием метода ультразвуковой кавитации лекарственных растворов. *Практическое руководство для врачей*. Екатеринбург: Vip-Ural, 2014.
 24. Плотнок Е. Э. Прогнозирование, профилактика, диагностика и лечение осложнений искусственного прерывания беременности. Москва, 2013.
 25. Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016; 215 (6): 684–703. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>.
 26. Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2018; 58 (3): 341–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/ajo.12754>.
 27. Pelzer ES, Willner D, Buttini M, Huygens F. A role for the endometrial microbiome in dysfunctional menstrual bleeding. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018; 111 (6): 933–43. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0992-6>.
 28. Duff P, Gibbs RS, Blanco JD, Clair PJS. Endometrial culture techniques in puerperal patients. *Obstetrics & Gynecology*. 1983; 61 (2): 217–22.
 1. 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. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015; 212 (5): 611–e1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.11.043>.
 2. 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? *Scientific Reports*. 2019; 9: 9905. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46173-0>.
 3. Polifke A, Schwedler A von, Gulba R, Bensmann R, Diltz A, Nassar NN, et al. Differential characteristics of vaginal versus endometrial microbiota in IVF patients. *Scientific Reports*. 2024; 14 (1): 1–16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-82466-9>.
 4. Franasia JM, Scott RT. Endometrial microbiome. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2017; 29 (3): 146–52. Available from: <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000357>.
 5. Fang RL, Chen LX, Shu WS, Yao SZ, Wang SW, Chen YQ. Barcoded sequencing reveals diverse intrauterine microbiomes in patients suffering with endometrial polyps. *American journal of translational research*. 2016; 8 (3): 1581.
 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. *PeerJ*. 2016; 4: e1602. Available from: <https://doi.org/10.7717/peerj.1602>.
 7. Kurcer MA, Egikyan NM, Saveleva NA, Sinicyna OV, Vatagina MA, Kutakova YuYu. Sravnitel'naya harakteristika vaginal'nogo i endometrial'nogo mikrobioma u pacientok so vtorichnym besplodiem, associirovannym s nishej rubca na matke posle kesareva secheniya. *Ginekologiya*. 2021; 23 (6): 499–503. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.26442/20795696.2021.6.201300>. Russian.
 8. Karahalil'sYu, Kononenko TS. Taksonomicheskij profil' mikrobioma endometriya pri hronicheskom endometrite. *Akusherstvo i ginekologiya: Novosti Mneniya Obucheniya*. 2022; 10 (4): 23–30. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.33029/2303-9698-2022-10-4-23-30>. Russian.
 9. Bui BN, Hoogenhuijze N van, Viveen M, Mol F, Teklenburg G, Bruin JP de, 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. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30591-2>.
 10. Jain M, Mladova E, Dobychina A, Kirilova K, Shicharina 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): 310–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/19396368.2023.2195040>.
 11. Masucci L, D'Ippolito S, De Maio F, Quaranta G, Mazzarella R, Bianco DM, et al. Celiac disease predisposition and genital tract microbiota in women affected by recurrent pregnancy loss. *Nutrients*. 2023; 15 (1): 221.
 12. Ying X, Xu G, Wang H, Wang Y. An altered uterine microbiota with endometrial hyperplasia. *BMC microbiology*. 2024; 24 (1): 258. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03379-1>.
 13. Kysanova 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. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-9-478-486>. Russian.
 14. Moreno I, Garcia-Grau I, Bau D, Perez-Villaroya D, Gonzalez-Monfort M, Vilella F, et al. The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2020; 222 (4): 296–305. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.01.031>.
 15. 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. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2024; 23: 49. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00710-6>.
 16. Zhao Y, Liao Y, Xu G, Wang Y. Endometrial microbiota alteration in female patients with endometrial polyps based on 16S rRNA gene sequencing analysis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2024; 14: 1351329. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1351329>.
 17. Vanakova AI, Dolgushina NV, Denisov PA, Goncharuk OD, Muraveva VV, Pripitnevich TV. Osobennosti mikrobioty polosti matki u pacientok s polipami endometriya. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2025; 1 (6): 6. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.24075/vrgmu.2025.007>. Russian.
 18. Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016; 199: 69–75. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.01.040>.
 19. 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. *Nature Communications*. 2017; 8: 875. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>.
 20. 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. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;

- 10: 350. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00350>.
21. Voroshilina ES, Zornikov DL, Kuposova OV, Islamidi DK, Ignatova KY, Abakumova EI, et al. The use of real-time PCR for evaluation of endometrial microbiota. *Bulletin of RSMU*. 2020; 1: 14–20. DOI: 10.24075/brsmu.2020.012.
22. Zornikov DL, Bekhter AA, Kornilov DO, Simarzina VM, Nechaeva DM, Karyakina AE, et al. Pipelle and endobrush catheters do not prevent contamination of endometrial samples by cervical microbiota. *Bulletin of RSMU*. 2025; (6): 89–95. DOI: 10.24075/brsmu.2025.073
23. Oboskalova T, Gluhov E, Lavrenteva I, Bogdanova A, Kozyreva E, Neff E, i dr. Profilaktika i lechenie vospalitel'nyh zabolevanij v akusherstve i ginekologii s ispol'zovaniem metoda ul'trazvukovoj kavitacii lekarstvennyh rastvorov. *Prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachej*. Ekaterinburg: Vip-Ural, 2014. Russian.
24. Plotko EE. Prognozirovanie, profilaktika, diagnostika i lechenie oslozhnenij iskusstvennogo preryvaniya beremennosti. Moskva, 2013. Russian.
25. Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2016; 215 (6): 684–703. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>.
26. Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 2018; 58 (3): 341–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/ajo.12754>.
27. Pelzer ES, Willner D, Buttini M, Huygens F. A role for the endometrial microbiome in dysfunctional menstrual bleeding. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018; 111 (6): 933–43. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0992-6>.
28. Duff P, Gibbs RS, Blanco JD, Clair PJS. Endometrial culture techniques in puerperal patients. *Obstetrics & Gynecology*. 1983; 61 (2): 217–22.

КОНСТРУИРОВАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АТТЕНУИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ИНТЕРЛЕЙКИН-1 β ЧЕЛОВЕКА

Е. А. Романовская-Романько , О. О. Ожерельева, М. А. Плотникова, А. С. Алтухов, М. А. Стукова

Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

Применение живых аттенуированных гриппозных векторов требует баланса между снижением вирулентности и сохранением иммуногенности. Один из возможных подходов для усиления иммуногенности и защитной эффективности таких аттенуированных штаммов — встраивание в геном вируса трансгенов, способных активировать врожденный и адаптивный иммунитет. Цель экспериментального исследования — сконструировать рекомбинантные аттенуированные вирусы гриппа, способные экспрессировать IL1 β человека, и провести сравнительный анализ их репликативных свойств, иммуностимулирующей активности и профиля безопасности *in vivo*. Рекомбинантные штаммы с различным положением трансгена получили методом обратной генетики, провели оценку их ростовых характеристик и уровня экспрессии трансгена. Активацию генов врожденного иммунитета изучали в культуре клеток A549 в ответ на заражение рекомбинантными штаммами. Аттенуированный фенотип подтверждали в модели мышей. В представленном исследовании были сконструированы и получены рекомбинантные аттенуированные вирусы гриппа, имеющие укороченный до 124 аминокислот белок NS1 и экспрессирующие IL1 β человека. Подтверждена способность рекомбинантных штаммов экспрессировать функционально активный IL1 β , показано усиление относительной экспрессии генов врожденного иммунитета (RIG-I, MDA5, OAS1), а также провоспалительных цитокинов (IL6 и TNF α) в ответ на инфицирование клеток рекомбинантными штаммами по сравнению с пустым вектором NS124. Так, экспрессия гена IL6 увеличивалась более чем в 10 раз ($p < 0,0001$), а гена TNF α — в 3–4 раза ($p < 0,0001$). В экспериментах *in vivo* был подтвержден аттенуированный фенотип полученных рекомбинантных штаммов, что свидетельствует о сохранении профиля безопасности наряду с усиленной иммуностимулирующей активностью.

Ключевые слова: вирус гриппа А, рекомбинантный гриппозный вектор, интерлейкин-1 бета, белок NS1

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 25-25-00939).

Вклад авторов: Е. А. Романовская-Романько — концепция, выполнение исследований, обработка материала, написание статьи; О. О. Ожерельева — обзор литературы, конструирование плазмид, выполнение исследований, статистическая обработка данных; М. А. Плотникова — выполнение исследований, статистическая обработка данных; А. С. Алтухов — выполнение исследований; М. А. Стукова — утверждение окончательного варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева (протокол № 07 от 23 апреля 2026 г.). Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС, федеральными руководящими принципами и институциональной политикой ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева.

 **Для корреспонденции:** Екатерина Андреевна Романовская-Романько
ул. Профессора Попова, д. 15/17, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия; romromka@yandex.ru

Статья получена: 02.07.2026 **Статья принята к печати:** 28.07.2026 **Опубликована онлайн:** 17.08.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.044

Авторские права: © 2026 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/>).

CONSTRUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE ATTENUATED RECOMBINANT INFLUENZA VIRUS STRAINS EXPRESSING HUMAN INTERLEUKIN 1 β

Romanovskaya-Romanko EA , Ozhereleva OO, Plotnikova MA, Altuhov AS, Stukova MA

Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

The use of live attenuated influenza vectors requires a balance between decreasing virulence and preserving immunogenicity. One possible approach to enhancing immunogenicity and protective efficacy of such attenuated strains is the integration of transgenes capable of activating the innate and adaptive immunity in the viral genome. The experimental study aimed to construct recombinant attenuated influenza viruses capable of expressing human IL1 β and conduct comparative analysis of their replication properties, immunostimulatory activity, and safety profile *in vivo*. Recombinant strains with different transgene localization were generated by the reverse genetics method; their growth characteristics and transgene expression levels were assessed. Activation of the innate immunity genes in response to infection with recombinant strains was assessed in the A549 cell culture. The attenuated phenotype was confirmed in the mouse model. In the reported study, recombinant attenuated influenza viruses having the NS1 protein truncated to 124 amino acids and expressing human IL1 β were constructed and produced. It was confirmed that recombinant strains could express the functionally active IL1 β ; the increase in relative expression of the innate immunity genes (RIG-I, MDA5, OAS1) and pro-inflammatory cytokines (IL6 and TNF α) in response to the infection of cells with recombinant strains compared to the empty vector NS124 was shown. Thus, the IL6 gene expression increased more than 10-fold ($p < 0.0001$) and that of the TNF α gene increased 3–4-fold ($p < 0.0001$). The attenuated phenotype of the recombinant strains produced was confirmed in *in vivo* experiments, which suggests preservation of the safety profile along with the enhanced immunostimulatory activity.

Keywords: influenza A virus, recombinant influenza vector, interleukin-1 beta, NS1 protein

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation (project No. 25-25-00939).

Author contribution: Romanovskaya-Romanko EA — concept, testing, material processing, manuscript writing; Ozhereleva OO — literature review, constructing plasmids, testing, statistical data processing; Plotnikova MA — testing, statistical data processing; Altuhov AS — testing; Stukova MA — approval of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation (protocol No. 07 dated April 23, 2026). Animals were kept under standard conditions in accordance with the Directive 2010/63/EC, federal guidelines, and the institutional policy of the Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Health of the Russian Federation.

 **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko
Professora Popova, 15/17, St. Petersburg, 197022, Russia; romromka@yandex.ru

Received: 02.07.2026 **Accepted:** 28.07.2026 **Published online:** 17.08.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.044

Copyright: © 2026 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/>).

Применение живых аттенуированных гриппозных векторов требует тонкого баланса между снижением вирулентности штамма и сохранением его иммуногенности. Одним из возможных путей достижения этого баланса является направленное модулирование иммунного ответа за счет экспрессии иммуномодулирующих молекул в составе генома гриппозного вектора для усиления защитного ответа без снижения вирулентности штамма.

Аттенуированные штаммы вируса гриппа с модифицированным белком NS1 являются перспективной платформой для разработки живой гриппозной вакцины с широким спектром защитной эффективности, а также для создания векторов доставки целевых антигенов [1]. Вирусы с укороченным NS1-белком способны к эффективной репликации в производственных субстратах, обладая при этом аттенуированным фенотипом в иммунокомпетентных системах [2]. Аттенуация таких штаммов обусловлена тем, что вирусы с укороченным неструктурным белком NS1 не способны подавлять врожденный иммунный ответ хозяина, за счет утраты С-концевого эффекторного домена, опосредующего взаимодействие с клеточными факторами иммунной регуляции и процессинга мРНК [3]. Однако сохранение РНК-связывающего домена в N-концевом участке белка NS1 может обуславливать сохранение иммуносупрессивной активности таких вирусов за счет ограничения процессинга и созревания ключевых медиаторов инфламмасомо-зависимой сигнализации — интерлейкина-1 β (IL1 β) и интерлейкина 18 (IL18) [4]. Поскольку эти цитокины играют важнейшую роль в формировании эффективного иммунного ответа, в случае гриппозного штамма, имеющего белок NS1, укороченный до 124 аминокислот, может наблюдаться ограничение иммуностимулирующего потенциала такого штамма. В связи с этим дальнейшая оптимизация безопасности и иммуногенности таких гриппозных векторов является актуальной задачей.

Один из перспективных подходов к повышению иммуногенности аттенуированных штаммов — встраивание в вирусный геном дополнительных трансгенов, которые кодируют иммуномодулирующие факторы, способные обеспечить направленную активацию врожденного и адаптивного иммунного ответа.

Особый интерес в контексте усиления противогриппозного иммунного ответа представляют цитокины семейства интерлейкина-1, способные усиливать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунный ответ при совместном интраназальном введении с антигеном [5]. Ранее было показано, что интраназальное введение IL1 β в комбинации с гриппозным антигеном индуцирует формирование Т-резидентных клеток памяти, которые играют ключевую роль в формировании перекрестной защиты против гетерологичных штаммов вируса гриппа [6]. Экспрессия биологически активной молекулы IL1 β рекомбинантным аттенуированным штаммом вируса гриппа может способствовать усилению специфического иммунного ответа на гриппозные антигены, обеспечивая эффективную защиту широкого спектра действия.

Цель исследования — сконструировать и получить рекомбинантные аттенуированные вирусы гриппа, имеющие укороченный до 124 аминокислот белок NS1 и экспрессирующие IL1 β человека, и провести сравнительный анализ их репликативных свойств, иммуностимулирующей активности и профиля безопасности *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмидные конструкции

Для сборки рекомбинантных штаммов были получены две различные по конструкции плазмиды, кодирующие последовательности химерного геномного сегмента NS, со вставкой последовательности активной формы IL1 β [7]. Для рекомбинантного штамма IL1b_2A_NS124 плазида была получена на основе ранее сконструированной плазмиды pHW-PR8-sF-NS [8]: последовательность IL1 β с сигнальным пептидом IgGк, синтезированная *de novo* («Евроген», Россия) была встроена в N-концевую часть химерного полипротеина, включавшего в себя транген, за которым следовали последовательности укороченного до 124 аминокислот NS1 и NS2/NEP, разделенные сайтами 2A, экспрессия NEP при этом обеспечивалась за счет сайта 2A без сплайсинга. Для рекомбинантного штамма NS124_SS_IL1b в плазмиде последовательность трансгена с сигнальным пептидом IgGк была вставлена после последовательности укороченного до 124 аминокислот белка NS1 через кассету перекрывающихся стоп-старт кодонов, обеспечивающих реинициацию трансляции. Плазмиды, кодирующие последовательности остальных внутренних и поверхностных белков вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR/8/34), были получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева».

Культуры клеток

Клетки MDCK (#FR-58; IRR, США) культивировали в среде АльфаMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки SC-biol («Биолот», Россия). Клетки A549 (CCL-185; ATCC, США) и HEK293 (ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева») культивировали в среде DMEM/F12 («Биолот», Россия) с добавлением 10% сыворотки SC-biol («Биолот», Россия).

Получение рекомбинантных вирусов

Рекомбинантные вирусные штаммы были получены методом трансфекции ко-культуры клеток MDCK/HEK293 набором из восьми плазмид, кодирующих геномные сегменты вируса гриппа. В качестве трансфекционного агента использовали реагент GenJect39 («Молекта», Россия). Последующие этапы пассирования рекомбинантных вирусных штаммов проводили в 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (ОАО «Птицефабрика Синявинская», пос. Приладожский, Россия) при температуре 34 °С. Гриппозный вектор (NS124), имеющий укороченный до 124 аминокислот белок NS1 без вставки трансгена, был получен из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России (лаборатория векторных вакцин).

Определение инфекционной активности

Инфекционную активность рекомбинантных вирусных штаммов определяли методом предельных разведений в системе РКЭ и культуре клеток MDCK [8]. Для определения 50%-й инфекционной дозы был использован метод Рида и Менча, титр выражали в log₁₀ ЭИД₅₀ (ТИД₅₀)/мл.

Определение длины химерного сегмента NS методом ОТ-ПЦР

Вирусную РНК выделяли набором реагентов RNeasy Mini Kit (Qiagen, Нидерланды). Генетический материал амплифицировали набором реагентов БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра («Биолабмикс», Россия) и праймеров, специфичных к сегменту NS [9]. Амплификацию проводили с использованием сенсорного термоциклера GenTier 96E PCR Cycler (TianLong, China). Анализ длины ПЦР-продукта проводили методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с использованием $\times 1$ TAE буфера.

Количественное определение IL1 β

Для получения образцов 10-дневные РКЭ (суточный монослой клеток MDCK) инфицировали рекомбинантными вирусными штаммами или пустым вектором NS124 в дозе 2×10^5 ЭИД₅₀ (1,0 ТИД₅₀/кл.), образцы отбирали через 48 ч (24 ч) инкубирования при температуре 34 °C (37 °C, 5% CO₂). Уровень IL1 β в пробах оценивали количественно методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора Interleukin-1 beta-EIA-BEST («Вектор-Бест», Россия).

Измерение биологической активности IL1 β

Биологическую активность IL1 β определяли методом клеточного пролиферационного теста, основанного на стимуляции пролиферации IL1-зависимой линии клеток D10.G4.1 в присутствии субоптимальной концентрации конканавалина А. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 и вносили в 96-луночные планшеты вместе с серийными разведениями стандартного образца (WHO IL1 β) и исследуемых проб. После инкубации в течение 72 ч при температуре 37 °C, 5% CO₂ пролиферацию оценивали по оптической плотности с использованием ХТТ-теста. Активность образцов рассчитывали по калибровочной кривой относительно международного стандарта и выражали в МЕ/мл.

Количественная оценка инфицированных клеток

Определение доли инфицированных клеток проводили методом проточной цитометрии. Суточный монослой клеток A549 заражали рекомбинантными штаммами или пустым вектором в дозе 1,0 ТИД₅₀/кл. в трех независимых повторах для каждого вируса и инкубировали в течение 20 ч в среде, содержащей 2% сыворотки. В качестве отрицательного контроля использовали незараженные клетки (КК). Количество зараженных клеток в процентах считали с помощью проточного цитометра, окрашивая клетки набором Zombie Aqua Fixable Viability Kit и FITC-мечеными антителами к NP вируса гриппа. Сбор данных осуществляли на проточном цитометре CytoFLEX Flow Cytometer (Beckman Coulter, США), анализ проводили с использованием программного обеспечения Kaluza Analysis v2 (Beckman Coulter, США).

Иммунофлуоресценция

Клетки MDCK заражали рекомбинантными штаммами или пустым вектором в дозе 1,0 ТИД₅₀/клетку и инкубировали в течение 20 ч в среде, содержащей 2% сыворотки. Для детекции белка NS1 вируса гриппа А в пермобилизованных Triton X-100 клетках использовали

поликлональную сыворотку мыши и конъюгат goat-anti mouse Alexa488 (Abcam, Великобритания). Визуализацию клеток методом флуоресцентной микроскопии проводили с использованием Cytell Imaging System (Image Solutions, Великобритания).

Оценка экспрессии методом ОТ-ПЦР

Для оценки экспрессии генов врожденного иммунного ответа суточный монослой клеток A549 заражали рекомбинантными вирусными штаммами или пустым вектором в дозе 1,0 ТИД₅₀/кл. (по четыре повтора). Через 24 ч из клеток проводили экстракцию тотальной РНК с использованием набора ExtractRNA («Евроген», Россия). РНК обрабатывали ДНКазой, не содержащей РНКазы RQ1 (Promega, США). Реакцию ОТ проводили с использованием 1 мкг РНК, 0,5 мкг праймеров oligo-dT16 (DNA synthesis, Россия) и набора RNAscribe RT (BioLabMix, Россия). Для проведения ПЦР использовали набор BioMaster HS-ПЦР (BioLabMix, Россия) и последовательности праймеров и зондов, разработанные ранее [10]. Значения Ct были нормализованы по отношению к гену GAPDH (ген домашнего хозяйства). Относительную экспрессию рассчитывали методом $\Delta\Delta Ct$, принимая за единицу экспрессию целевых генов в незараженных клетках.

Лабораторные животные

Самки нелинейных мышей CD1 в возрасте 6–8 недель были приобретены в питомнике лабораторных животных «Рапполово» (Филиал НИЦ «Курчатовский институт» ПИЯФ ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область, Россия).

Безопасность рекомбинантных векторов при интраназальном введении мышам

Вирусные штаммы вводили мышам интраназально под легкой эфирной анестезией в объеме 30 мкл с использованием механического дозатора. Рекомбинантные штаммы и пустой вектор вводили животным в дозе 5,5 log₁₀ ЭИД₅₀, вирус A/Puerto Rico/8/34, обладающий полноразмерным геном NS (PR8 wt), — в дозе 3,5 log₁₀ ЭИД₅₀.

Статистическая обработка

Статистический анализ и графическая визуализация были выполнены с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., США). Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (С.О.). Для межгруппового сравнения использовали дисперсионный анализ с последующим применением теста множественного сравнения Тьюки или непараметрического теста Краскела–Уоллиса, как указано в подписях к рисункам. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование и характеристика аттенуированных гриппозных вирусов, экспрессирующих IL1 β человека

Рекомбинантные штаммы вируса гриппа, экспрессирующие IL1 β , были получены на основе штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), содержащего укороченный до 124 аминокислот

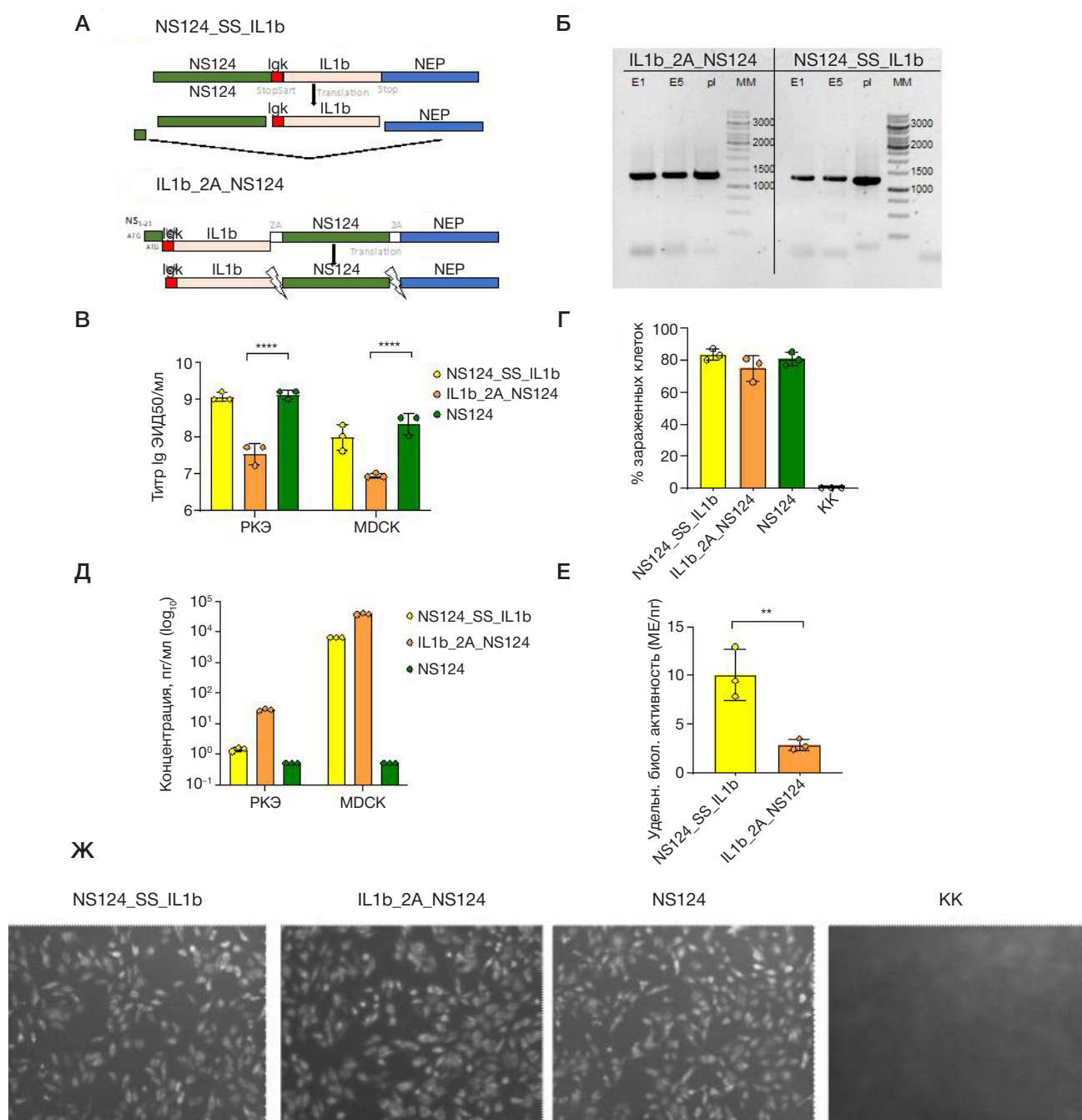


Рис. 1. Конструирование и характеристика рекомбинантных вирусов гриппа А, экспрессирующих IL1β. **А.** Схемы геномных конструкций химерного геномного сегмента NS рекомбинантных вирусов IL1b_2A_NS124 и NS124_SS_IL1b. **Б.** Электрофорезаграмма продуктов амплификации геномного сегмента NS рекомбинантных штаммов. MM — маркер молекулярного веса; E1 — первый эмбриональный пассаж; E5 — пятый эмбриональный пассаж; pl — контрольная плазмида. **В.** Репродуктивные свойства рекомбинантных вирусных штаммов в системе 10-дневных РКЭ и культуре клеток MDCK. Представлены результаты оценки инфекционной активности пятого эмбрионального пассажа, средний титр log₁₀ЭИД₅₀ (ТИД₅₀) ± С.О. **Г.** Эффективность инфицирования клеток A549 рекомбинантными вирусными штаммами. Представлен средний процент инфицированных клеток для трех повторов ± С.О. **Д.** Количественное определение уровня IL1β в аллантоисной жидкости и клеточном супернатанте клеток MDCK, зараженных рекомбинантными вирусными штаммами, методом ИФА. **Е.** Удельная биологическая активность IL1β. Расчетное количество биологически активной формы IL1β, определенной в пролиферативном тесте с использованием репортерной системы HEK-Blue IL1β, в перерасчете на 1 пг IL1β, детектируемого методом ИФА. **Ж.** Репрезентативные изображения клеток A549, полученные методом флуоресцентной микроскопии. Серым цветом показаны результаты окрашивания белка NS1, выявленного с использованием Alexa Fluor 488 (488/509 нм). Увеличение ×40.

белок NS1 [11]. Для сборки вирусов использовали два варианта плазмиды, кодирующие модифицированный ген NS. В первом случае последовательность трансгена была вставлена после последовательности, кодирующей первые 124 аминокислоты белка NS1 вируса гриппа (NS124_SS_IL1b). Во втором варианте последовательность трансгена с сигнальным пептидом IgGk была вставлена перед последовательностью, кодирующей вирусный белок NS124, и была отделена от него сайтом 2A,

обеспечивающим ко-трансляционное разделение белков (IL1b_2A_NS124) (рис. 1А).

Для оценки генетической стабильности сохранения гетерологичной вставки в геномном сегменте NS рекомбинантные вирусные штаммы культивировали на протяжении пяти последовательных пассажей в системе РКЭ и оценивали стабильность сохранения вставки трансгена методом ОТ-ПЦР. Оба вирусных вектора были генетически стабильны, результаты ОТ-ПЦР

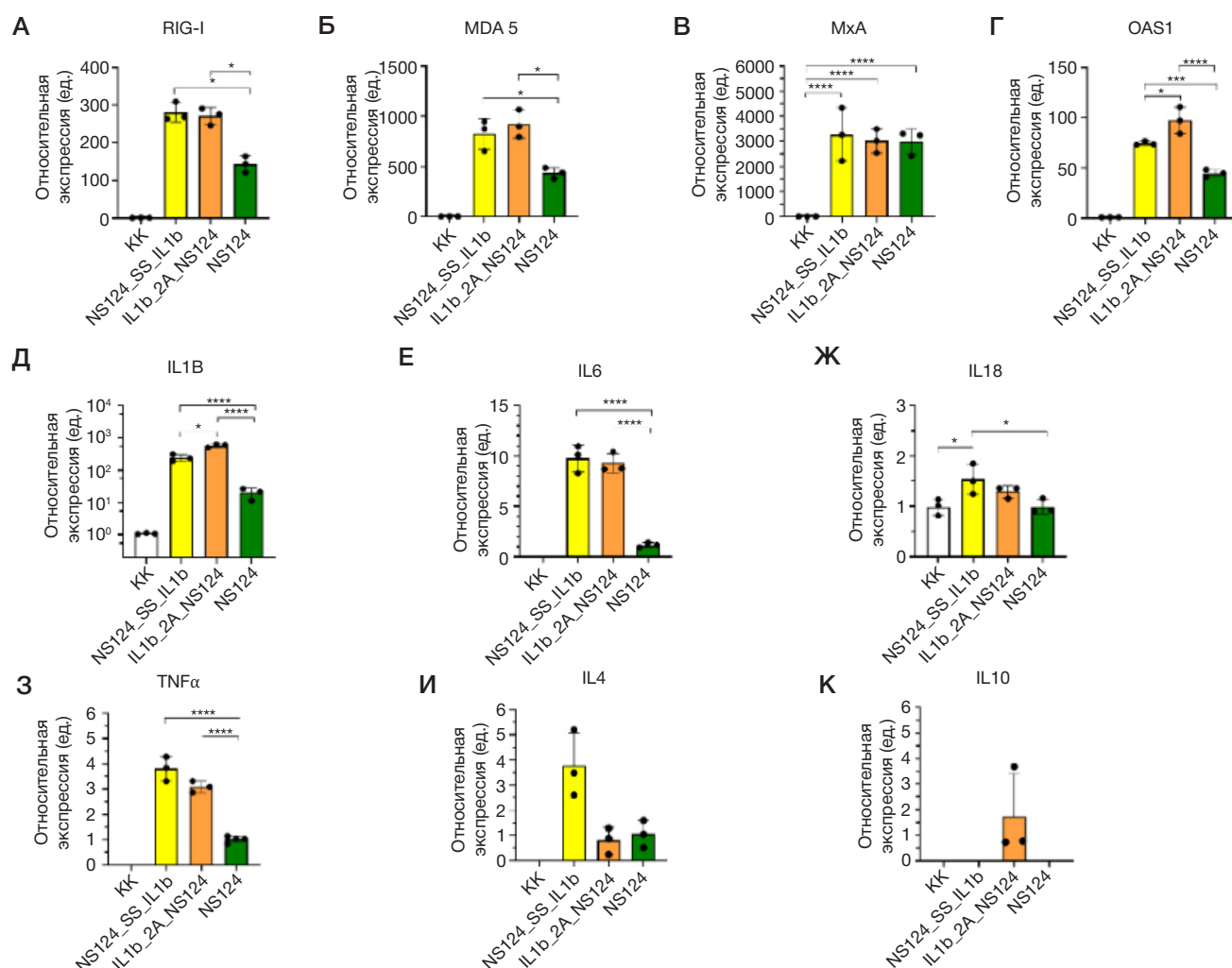


Рис. 2. Активация экспрессии внутриклеточных сенсоров (А, Б), противовирусных белков (В, Г) и цитокинов (Д–К) в клетках A549 в ответ на заражение рекомбинантными штаммами вируса гриппа, экспрессирующими IL1 β . Относительная экспрессия матричной РНК (мРНК) представлена в виде средних значений для трех биологических повторов (столбики) и индивидуальных значений для каждого измерения (точки). Для оценки статистической значимости различий в нормализованных значениях ΔC_t использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Тьюки — для множественных сравнений (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$)

демонстрировали соответствие длины геномного сегмента NS рекомбинантных штаммов контрольным плазмидам на всех пассажах (рис. 1Б).

Репродуктивная активность рекомбинантных штаммов в системе ПКЭ и на культуре клеток MDCK была сходна. Ростевые характеристики штамма NS124_SS_IL1b не отличались от показателей исходного гриппозного штамма с укороченным белком NS1, не несущего трансген, инфекционный титр достигал $8,0 (9,0) \log_{10}$ ТИД₅₀ (ЭИД₅₀)/мл и был достоверно выше (на $1-1,5 \log_{10}$), чем у рекомбинантного штамма IL1b_2A_NS124, экспрессирующего IL1 β перед белком NS1 (рис. 1В). При этом способность инфицировать перmissive культуру у обоих рекомбинантных штаммов была сопоставима и не отличалась от исходного вируса без вставки. При заражении клеточного моноклона штаммами NS124_SS_IL1b, IL1b_2A_NS124 и NS124 в дозе 1,0 инфекционных единиц на клетку, доля зараженных клеток составила $83 \pm 3,5\%$, $75 \pm 8,0\%$ и $81 \pm 4,0\%$ соответственно (рис. 1Г).

Экспрессию цитокина определяли количественно с помощью ИФА в аллантоисной жидкости и супернатанте зараженных клеток MDCK. Экспрессия IL1 β на культуре клеток и в эмбрионах была многократно выше для штамма IL1b_2A_NS124 ($38\,000 \pm 2000$ пг/мл; $28,0 \pm 2,0$ пг/мл), чем у штамма NS124_SS_IL1b (6400 ± 51 пг/мл; $1,4 \pm 0,21$ пг/мл)

(рис. 1Д). Для интерлейкин-содержащих проб аллантоиса была определена удельная биологическая активность цитокина с помощью репортерной системы HEK-Blue IL1 β . Для штамма NS124_SS_IL1b доля биологически активной формы была выше ($10,0 \pm 2,61$ ME/пг), чем для IL1b_2A_NS124, у которого она составляла $2,8 \pm 0,56$ ME/пг (рис. 1Е). Тем не менее, общее количество биологически активной формы IL1 β было выше у штамма IL1b_2A_NS124, по сравнению с NS124_SS_IL1b.

Методом иммунофлуоресценции было продемонстрировано, что вставка трансгена перед последовательностью белка NS1 у штамма IL1b_2A_NS124 не препятствовала экспрессии вирусного белка NS1 в зараженных клетках (рис. 1Ж).

Активация генов врожденного иммунного ответа рекомбинантными штаммами

Для рекомбинантных штаммов, экспрессирующих IL1 β человека, на клетках линии A549 была проведена оценка активации экспрессии генов внутриклеточных сенсоров RIG-I и MDA5, противовирусных белков MxA и OAS1 и цитокинов IL1 β , IL6, IL18, TNF α , IL4 и IL10 в ответ на инфицирование по сравнению с исходным гриппозным вектором, не имеющим вставки трансгена.

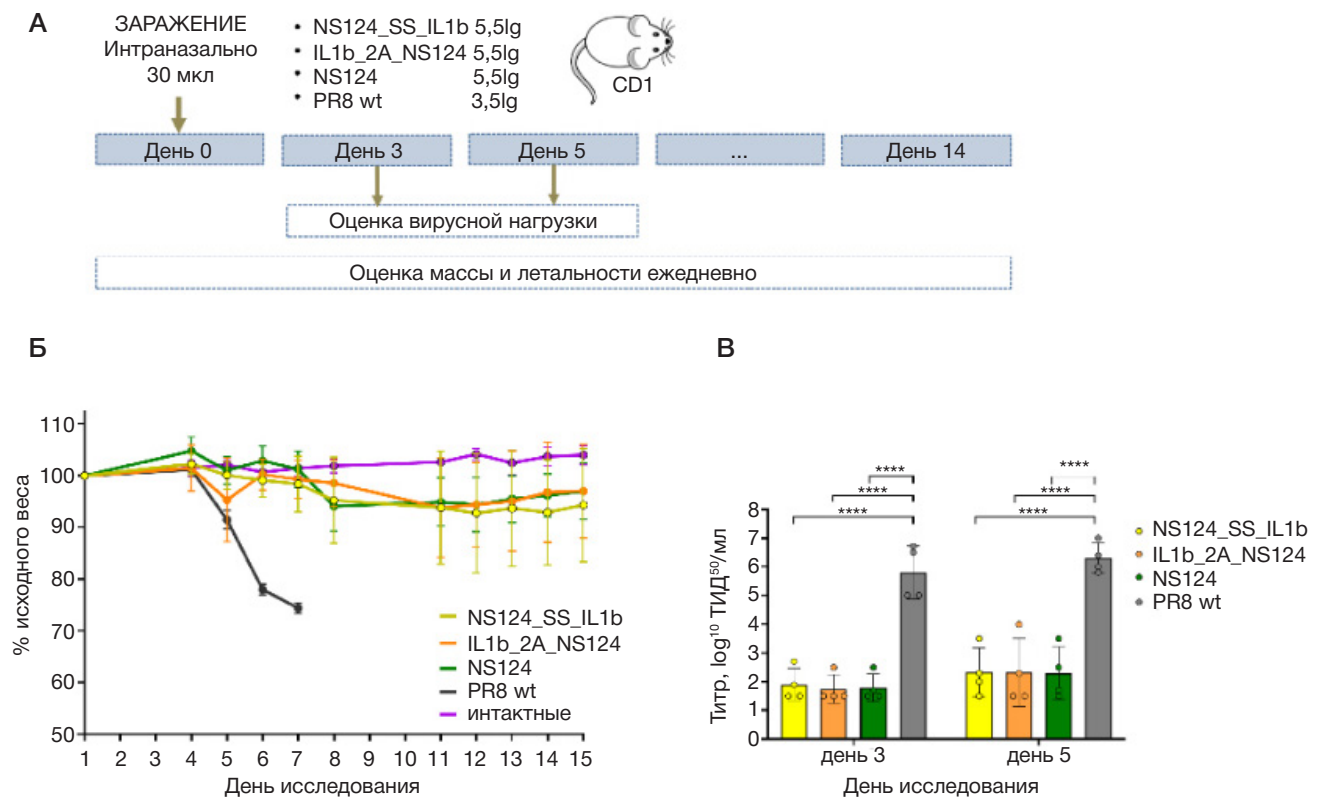


Рис. 3. Оценка безопасности рекомбинантных гриппозных штаммов, экспрессирующих IL1 β , при интраназальном введении мышам. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Динамика массы тела животных ($n = 5$ в группе) после интраназального введения рекомбинантных вирусов. **В.** Оценка вирусной нагрузки в тканях легких мышей на 3-й и 5-й дни после интраназального введения рекомбинантных вирусных штаммов, экспрессирующих IL1 β . Столбики обозначают среднее значение показателя для группы ($n = 4$) $\pm$ С.О., точки — индивидуальные значения показателя для каждого животного. Для оценки статистической значимости различий среднegrupповых значений использовали двухфакторный дисперсионный анализ, тест Даннета — для множественных сравнений с группой контроля PR8 wt (**** — $p < 0,0001$).

В целом рекомбинантные гриппозные штаммы IL1b_2A_NS124 и NS124_SS_IL1b демонстрировали схожие транскрипционные профили практически по всем исследованным генам. При этом данные профили статистически значимо отличались от таковых, индуцируемых пустым вектором NS124 (рис. 2).

Инфицирование рекомбинантными конструкциями сопровождалось повышением экспрессии IL1 β , уровень которого превышал контрольные значения более чем в 100 раз. Была также показана выраженная индукция экспрессии гена IL6 (повышение более чем в 10 раз) и гена TNF α (повышение в 3–4 раза) на достоверно более высоком уровне, чем при заражении клеток пустым вектором NS124.

Инфицирование клеток обоими рекомбинантными штаммами, так же как и пустым вектором, приводило к индукции экспрессии IL4. Уровень мРНК IL4 в случае штамма NS124_SS_IL1b был выше, однако статистически значимых отличий от двух других штаммов показано не было. Транскрипт IL10 был обнаружен только в случае заражения клеток рекомбинантным штаммом IL1b_2A_NS124.

При анализе компонентов системы распознавания патогенов в ответ на инфицирование клеток обоими рекомбинантными штаммами показано статистически значимое повышение уровней мРНК внутриклеточных сенсоров RIG-I и MDA5 относительно пустого вектора, что может указывать на усиление сигнальных путей, инициирующих врожденный противовирусный ответ.

В отношении интерферон-стимулируемых генов (ISG) было показано, что все гриппозные штаммы, независимо от наличия трансгена, активировали экспрессию генов MxA и OAS1, что согласуется с известной способностью вирусов гриппа с укороченным белком NS1 индуцировать

интерфероновый ответ. Для штаммов, несущих вставку IL1 β , показан достоверно более высокий уровень относительной экспрессии гена OAS1. В то время как уровень активации гена MxA не зависел от наличия в геноме вируса вставки, кодирующей IL1 β , и был сопоставим для всех вирусных штаммов.

Безопасность рекомбинантных гриппозных штаммов при интраназальном введении мышам

Поскольку сконструированные рекомбинантные векторы, экспрессирующие IL1 β , потенциально могут быть использованы для разработки вакцинных препаратов, одним из основных параметров являются их безопасность и сохранение аттенуированного фенотипа, обусловленного укорочением белка NS1 до 124 аминокислот. В связи с этим была проанализирована безопасность рекомбинантных штаммов по таким показателям, как снижение массы тела, летальность и вирусыведение инфекционного вируса из респираторного тракта животных (рис. 3А).

У животных, получивших оба рекомбинантных штамма, показано незначительное снижение массы тела, сопоставимое с показателями в группе животных, получивших пустой вектор (рис. 3Б). Летальность не была зафиксирована ни в одной из групп животных, получивших штаммы с укороченным NS1-белком, в то время как в группе вируса дикого типа к 7-му дню исследования летальность составила 100%. Уровень репликации рекомбинантных штаммов в тканях легких был низкий, сопоставимый с показателями для пустого вектора. Инфекционный титр вируса для обоих штаммов был достоверно ниже (в 10^4 раз) по сравнению с вирусом гриппа дикого типа (рис. 3В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе были сконструированы рекомбинантные вирусы гриппа на основе аттенуированного вируса с укороченным белком NS1, экспрессирующие IL1 β человека, отличающиеся локализацией трансгена. Показано, что встраивание трансгена в геном вируса приводит к дополнительной активации генов врожденного иммунного ответа, а положение вставки относительно открытой рамки считывания белка NS1 влияет на репродуктивные свойства штамма и уровень экспрессии целевого белка. При этом оба штамма сохраняли аттенуированный фенотип, поскольку экспрессия IL1 β не компенсировала дефект белка NS1 в подавлении иммунного ответа хозяина.

Оба полученных рекомбинантных штамма были генетически стабильны, что является важным параметром для производственных штаммов, однако различались по ростовым характеристикам. Штамм NS124_SS_IL1b сохранял ростовые характеристики, сопоставимые с пустым вектором, в то время как репликативные свойства штамма IL1b_2A_NS124 были ниже на 1,0–1,5 log₁₀. Снижение ростовых свойств штамма IL1b_2A_NS124 может быть обусловлено ко-трансляционной экспрессией трансгена, поскольку в данной конструкции синтез IL1 β и белка NS1 происходит как единый полипротеин с последующим расщеплением по сайту 2A, что может создавать стерические препятствия или влиять на кинетику сборки вирионов. При этом было показано, что встраивание трансгена не препятствовало инфицированию перmissive клеток, а также не снижало уровня экспрессии самого белка NS1.

Показано, что порядок встраивания трансгена в геном гриппозного вектора имеет важное значение для уровня экспрессии последнего [12]. Более высокий уровень продукции IL1 β был показан для штамма IL1b_2A_NS124. Полученные результаты могут объясняться тем, что в конструкции штамма IL1b_2A_NS124 трансген располагается перед последовательностью белка NS1, в результате чего может обеспечиваться его более эффективная трансляция, обусловленная ранним доступом к рибосоме и отсутствием вторичных структур, связанных с вирусной РНК. Несмотря на то что удельная биологическая активность IL1 β (МЕ/пг) была выше в случае штамма NS124_SS_IL1b, общее количество функционально активного цитокина было больше для штамма IL1b_2A_NS124. Это позволяет предположить, что положение вставки трансгена может влиять не только на количественную продукцию белка, но и на посттрансляционные модификации и процессинг зрелой формы IL1 β [8].

Анализ уровня экспрессии генов врожденного иммунного ответа на клетках A549 в ответ на инфицирование рекомбинантными штаммами показал качественно схожие профили активации для обеих конструкций, которые при этом достоверно отличались от показателей, в ответ на инфицирование пустым вектором NS124. Инфицирование клеток рекомбинантными штаммами NS124_SS_IL1b и IL1b_2A_NS124 приводило к повышению уровней мРНК внутриклеточных сенсоров RIG-I и MDA5, что согласуется с концепцией перекрестного взаимодействия между воспалительными сигнальными путями и системой распознавания патогенов. Активация RIG-I/MDA5 пути может усиливать положительную

обратную связь, улучшающую способность клеток детектировать генетический материал вируса и инициировать каскад интерфероновой ответа [13]. Активация экспрессии интерферон-стимулируемых генов в ответ на заражение рекомбинантными штаммами, экспрессирующими IL1 β , и пустым вектором NS124, была различна. Так, все штаммы, в том числе и пустой вектор, активировали экспрессию MxA на сопоставимом уровне, что отражает известную способность вирусов с укороченным белком NS1 индуцировать интерфероновый ответ. Уровень экспрессии OAS1 был достоверно выше для конструкций, экспрессирующих IL1 β . Данное отличие демонстрирует, что IL1 β способен избирательно модулировать определенные ветви ISG-ответа, возможно через сигнальные пути, ассоциированные с NF- κ B или MAPK, которые являются мишенями для сигналинга рецептора IL1 [14]. Дополнительное усиление экспрессии OAS1 может иметь физиологическое значение, поскольку белок OAS1 непосредственно участвует в деградации вирусной РНК через активацию рибонуклеазы L, что может более эффективно ограничивать репликацию вируса на ранних стадиях инфекции, обеспечивая вирусу аттенуированный фенотип [15].

Поскольку IL1 β является не только иммуностимулятором, но и пирогенным фактором, необходимо было оценить сохранение аттенуированного фенотипа рекомбинантных штаммов с целью определения возможности их использования в качестве живых вакцинных штаммов. В ходе исследования было показано, что встраивание IL1 β в качестве трансгена в гриппозный вектор NS124 не нарушает аттенуированный фенотип, обусловленный делецией белка NS1. В респираторном тракте мышей оба рекомбинантных штамма NS124_SS_IL1b и IL1b_2A_NS124 демонстрировали низкий уровень репликации, схожий с пустым вектором и достоверно более низкий, чем у вируса дикого типа. Несмотря на ограниченную репликацию, обусловленную делецией NS1, добавление IL1 β , как показано в экспериментах *in vivo*, потенцирует активацию врожденного иммунитета, это позволяет предположить, что даже при низкой вирусной нагрузке экспрессия трансгена может обеспечить усиление адаптивного иммунного ответа без повышения реактогенности, ассоциированной с высокой репликацией живых вирусов. Для подтверждения данного предположения будут проведены исследования иммуногенности и протективной активности рекомбинантных штаммов *in vivo*. В целом, полученные нами данные согласуются с более ранними исследованиями, показавшими эффективность встраивания цитокинов (IL15, IL2 или CXCL10) в геном вируса гриппа с целью усиления иммуногенности [16–18].

ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют, что встраивание иммуномодулирующей молекулы IL1 β в геном аттенуированного вируса гриппа способно модулировать врожденный иммунный ответ и является возможной стратегией для создания живых вакцинных кандидатов с усиленной иммуногенностью без ущерба для их безопасного профиля. Однако в силу ограничений модели *in vitro* для определения клинической значимости и безопасности данного подхода необходима его дальнейшая апробация на животных моделях с оценкой воспроизводимости эффекта.

Литература

- Zhang H, Wang L, An Y, Chen Z. The applications of live attenuated influenza a virus with modified NS1 gene. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2025; 36 (1): 102471.
- García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998; 252 (2): 324–30.
- Zhang H, Floyd K, Fang Z, Hoffmann FA, Lee A, Froggatt HM, et al. Mucosal vaccination in mice provides protection from diverse respiratory threats. *Science*. 2026; eaea1260.
- Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol*. 2005; 86 (Pt 1): 185–95.
- Gwinn WM, Kirwan SM, Wang SH, Ashcraft KA, Sparks NL, Doil CR, et al. Effective induction of protective systemic immunity with nasally administered vaccines adjuvanted with IL-1. *Vaccine*. 2010; 28 (42): 6901–14.
- Lapiente D, Ruzsics Z, Thirion C, Tenbusch M. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses. *Vaccine*. 2018; 36 (19): 2712–20.
- Hailey KL, Li S, Andersen MD, Roy M, Woods VLJ, Jennings PA. Pro-interleukin (IL)-1beta shares a core region of stability as compared with mature IL-1beta while maintaining a distinctly different configurational landscape: a comparative hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry study. *J Biol Chem*. 2009; 284 (38): 26137–48.
- Pulkina A, Vasilyev K, Muzhikyan A, Sergeeva M, Romanovskaya-Romanko E, Shurygina AP, et al. IgGκ Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (14).
- Dittmann M, Hoffmann HH, Scull MA, Gilmore RH, Bell KL, Ciancanelli M, et al. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza a virus maturation. *Cell [Internet]*. 2015; 160 (4): 631–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.040>.
- Oleinik V, Plotnikova M, Yolshin N, Romanovskaya-Romanko E. Development and approbation of a quantitative PCR system for studying the expression of endosomal receptors and cytosolic nucleic acid sensors in mice. *Med Acad journal*. 2025; 1 (1): 90–100.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (11): 6108–13.
- Yildiz S, El Zahed SS, Villalón-Letelier F, Wang Q, Yelleswarapu S, Dawodu G, et al. Re-engineering segment 8 facilitates generation of a versatile live-attenuated influenza A virus vector platform for secretory protein delivery. *J Virol*. 2026; 100 (5): e0034726.
- Gaudino M, Lion A, Sagné E, Nagamine B, Oliva J, Terrier O, et al. The Activation of the RIG-I/MDA5 Signaling Pathway upon Influenza D Virus Infection Impairs the Pulmonary Proinflammatory Response Triggered by *Mycoplasma bovis* Superinfection. *J Virol*. 2023; 97 (2): e0142322.
- Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, Wu CY, Lee CW, Hsieh HL, et al. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal*. 2009; 21 (11): 1652–62.
- Harioudh MK, Perez J, Chong Z, Nair S, So L, McCormick KD, et al. Oligoadenylate synthetase 1 displays dual antiviral mechanisms in driving translational shutdown and protecting interferon production. *Immunity*. 2024; 57 (3): 446–461.e7.
- van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, Muster T, Egorov A, Seipelt J, et al. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36506.
- Ozhireleva O, Mustafaeva A, Pulkina A, Plotnikova M, Shuklina M, Shurygina AP, et al. A CXCL10-Expressing Influenza Vector Induces Robust Adaptive Immunity Despite Strong Attenuation. *Pharmaceutics*. 2026; 18 (6).
- Kittel C, Ferko B, Kurz M, Voglauer R, Sereinig S, Romanova J, et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol*. 2005; 79 (16): 10672–7.
- Zhang H, Wang L, An Y, Chen Z. The applications of live attenuated influenza a virus with modified NS1 gene. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2025; 36 (1): 102471.
- García-Sastre A, Egorov A, Matassov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998; 252 (2): 324–30.
- Zhang H, Floyd K, Fang Z, Hoffmann FA, Lee A, Froggatt HM, et al. Mucosal vaccination in mice provides protection from diverse respiratory threats. *Science*. 2026; eaea1260.
- Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. *J Gen Virol*. 2005; 86 (Pt 1): 185–95.
- Gwinn WM, Kirwan SM, Wang SH, Ashcraft KA, Sparks NL, Doil CR, et al. Effective induction of protective systemic immunity with nasally administered vaccines adjuvanted with IL-1. *Vaccine*. 2010; 28 (42): 6901–14.
- Lapiente D, Ruzsics Z, Thirion C, Tenbusch M. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses. *Vaccine*. 2018; 36 (19): 2712–20.
- Hailey KL, Li S, Andersen MD, Roy M, Woods VLJ, Jennings PA. Pro-interleukin (IL)-1beta shares a core region of stability as compared with mature IL-1beta while maintaining a distinctly different configurational landscape: a comparative hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry study. *J Biol Chem*. 2009; 284 (38): 26137–48.
- Pulkina A, Vasilyev K, Muzhikyan A, Sergeeva M, Romanovskaya-Romanko E, Shurygina AP, et al. IgGκ Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (14).
- Dittmann M, Hoffmann HH, Scull MA, Gilmore RH, Bell KL, Ciancanelli M, et al. A serpin shapes the extracellular environment to prevent influenza a virus maturation. *Cell [Internet]*. 2015; 160 (4): 631–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.040>.
- Oleinik V, Plotnikova M, Yolshin N, Romanovskaya-Romanko E. Development and approbation of a quantitative PCR system for studying the expression of endosomal receptors and cytosolic nucleic acid sensors in mice. *Med Acad journal*. 2025; 1 (1): 90–100.
- Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (11): 6108–13.
- Yildiz S, El Zahed SS, Villalón-Letelier F, Wang Q, Yelleswarapu S, Dawodu G, et al. Re-engineering segment 8 facilitates generation of a versatile live-attenuated influenza A virus vector platform for secretory protein delivery. *J Virol*. 2026; 100 (5): e0034726.
- Gaudino M, Lion A, Sagné E, Nagamine B, Oliva J, Terrier O, et al. The Activation of the RIG-I/MDA5 Signaling Pathway upon Influenza D Virus Infection Impairs the Pulmonary Proinflammatory Response Triggered by *Mycoplasma bovis* Superinfection. *J Virol*. 2023; 97 (2): e0142322.
- Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, Wu CY, Lee CW, Hsieh HL, et al. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal*. 2009; 21 (11): 1652–62.
- Harioudh MK, Perez J, Chong Z, Nair S, So L, McCormick KD, et al. Oligoadenylate synthetase 1 displays dual antiviral mechanisms

- in driving translational shutdown and protecting interferon production. *Immunity*. 2024; 57 (3): 446–461.e7.
16. van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, Muster T, Egorov A, Seipelt J, et al. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. *PLoS One*. 2012; 7 (5): e36506.
17. Ozhereleva O, Mustafaeva A, Pulkina A, Plotnikova M, Shuklina M, Shurygina AP, et al. A CXCL10-Expressing Influenza Vector Induces Robust Adaptive Immunity Despite Strong Attenuation. *Pharmaceutics*. 2026; 18 (6).
18. Kittel C, Ferko B, Kurz M, Voglauer R, Sereinig S, Romanova J, et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J Virol*. 2005; 79 (16): 10672–7.

FTIR-ПРИЗНАКИ ПЕРЕСТРОЙКИ БЕЛКОВ ДЕСНЕВОЙ ЖИДКОСТИ У ДЕТЕЙ ПРИ КАРИЕСЕ И ГИНГИВИТЕ

П. В. Середин¹✉, Ю. А. Ипполитов^{1,2}, И. Ю. Ипполитов^{1,2}, Д. Л. Голощапов¹, Т. А. Литвинова¹¹ Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия² Воронежский государственный медицинский университет имени Н. Н. Бурденко, Воронеж, Россия³ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Актуальность исследования связана с поиском малоинвазивных молекулярных признаков состояния тканей зубодесневого комплекса у детей. Цель пилотного исследования — выявить в пилотной выборке спектральные признаки перестройки белков десневой жидкости у детей 8–14 лет при кариесе и воспалительных изменениях десны (гингивите) на основе анализа ИК-спектральной полосы Амид III. Проанализированы образцы десневой жидкости, полученные у 20 детей 8–14 лет с различным стоматологическим статусом. ИК-спектры регистрировали методом синхротронной ИК-Фурье-спектроскопии на спектрометре Bruker Vertex 80/v в диапазоне 3800–700 см⁻¹ с акцентом на область Амид III. Вклад элементов вторичной структуры белков оценивали с помощью деконволюции спектрального профиля и методов многомерного анализа. В пилотной выборке кариес ассоциировался с направленным увеличением суммарного вклада компонент, соответствующих β-складчатым структурам. По данным суммарной оценки основных элементов вторичной структуры, вклад β-складчатых компонент во всех четырех аналитических группах превышал 50%, вклад неупорядоченных конформаций составлял примерно 21–31%, а вклад β-поворотов и α-спиральных компонент оставался менее 10–11%. При воспалительных изменениях десны отмечена тенденция к уменьшению вклада β-поворотов и относительно увеличению неупорядоченных конформаций. Таким образом, профиль полосы Амид III может отражать интегральные физико-химические изменения белков десневой жидкости при кариесе и гингивите. Выявленные особенности следует рассматривать как кандидатные спектральные признаки, имеющие гипотезо-генерирующий характер и требующие дальнейшей клинической проверки.

Ключевые слова: десневая жидкость, ИК-Фурье-спектроскопия, полоса Амид III, вторичная структура белков, деконволюция спектров, многомерный анализ, кариес, гингивит

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 26-15-00389, <https://rscf.ru/project/26-15-00389>.

Благодарности: авторы благодарят сотрудников инфракрасной линии синхротронного излучения Pohang Accelerator Laboratory (Pohang, Republic of Korea), где часть экспериментов была выполнена в рамках proposal 2023-1st-12D-001 IRS.

Вклад авторов: П. В. Середин — концепция, методология, интерпретация спектральных данных, написание текста; Ю. А. Ипполитов — клинический дизайн, формирование выборки, стоматологическое обследование; И. Ю. Ипполитов — формирование выборки, стоматологическое обследование; Д. Л. Голощапов — регистрация и обработка спектров, деконволюция и многомерный анализ; Т. А. Литвинова — анализ литературы, статистическая обработка, подготовка и редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ВГМУ имени Н. Н. Бурденко Минздрава России (протокол № 3 от 24 марта 2026 г.), выполнено в соответствии с этическими стандартами и Хельсинкской декларацией ВМА (2013 г.). От законных представителей участников получено добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Павел Владимирович Середин
Университетская площадь, д. 1, г. Воронеж, 394018, Россия; paul@phys.vsu.ru

Статья получена: 15.06.2026 **Статья принята к печати:** 21.07.2026 **Опубликована онлайн:** 31.07.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.042

Авторские права: © 2026 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/>).

FTIR SIGNATURES OF PROTEIN CONFORMATIONAL CHANGES IN GINGIVAL CREVICULAR FLUID IN CHILDREN WITH CARIES AND GINGIVITIS

Seredin PV¹✉, Ippolitov YuA^{1,2}, Ippolitov IYu^{1,2}, Goloshchapov DL¹, Litvinova TA¹¹ Voronezh State University, Voronezh, Russia² Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia³ Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

The relevance of the study is associated with the search for minimally invasive molecular signatures of the dentogingival complex tissue condition in children. A pilot study aimed to identify spectral signatures of protein conformational changes in gingival crevicular fluid from children aged 8–14 years with dental caries and gingival inflammation (gingivitis) based on analysis of the IR spectral Amide III band in a pilot cohort. Gingival crevicular fluid samples collected from 20 children aged 8–14 years with different dental status were analyzed. FTIR spectra were acquired using synchrotron-based Fourier transform infrared spectroscopy in a Bruker Vertex 80/v spectrometer in the range of 3800–700 cm⁻¹ with a focus on the Amide III region. Spectral deconvolution combined with multivariate analysis was used to estimate the contribution of protein secondary-structure elements. In the pilot cohort, dental caries was associated with a directed increase in the total contribution of components related to β-sheet structures. Based on the summed contributions of the main secondary structure elements, the β-sheet contribution exceeded 50% across the four analytical groups, the disordered component ranged approximately from 21 to 31%, and the contributions of β-turns and α-helical components remained below 10–11%. Inflammatory gingival changes showed a tendency toward a decreased contribution of β-turns and a relative increase in disordered conformations. Thus, the Amide III profile may reflect integral physicochemical changes in proteins of gingival crevicular fluid in individuals with caries and gingivitis. The reported features should be regarded as candidate spectral signatures of a hypothesis-generating nature that require further clinical validation.

Keywords: gingival crevicular fluid, Fourier transform infrared spectroscopy, Amide III band, protein secondary structure, spectral deconvolution, multivariate analysis, dental caries, gingivitis

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation, project No. 26-15-00389, <https://rscf.ru/project/26-15-00389>.

Acknowledgments: the authors express their gratitude to the staff of the Pohang Accelerator Laboratory synchrotron radiation-based infrared beamline (Pohang, Republic of Korea), where some experiments were conducted within the framework of the proposal 2023-1st-12D-001 IRS.

Author contribution: Seredin PV — study concept, methods, spectral data interpretation, manuscript writing; Ippolitov YuA — clinical design of the study, participant recruitment, dental patient examination; Ippolitov IYu — participant recruitment, dental patient examination; Goloshchapov DL — spectrum acquisition and processing, deconvolution and multivariate analysis; Litvinova TA — literature review, statistical processing, manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study approved by the Ethics Committee of the Burdenko Voronezh State Medical University (protocol No. 3 dated March 24, 2026) was conducted in accordance with ethical standards and the World Medical Association Declaration of Helsinki (2013 update). The informed consent for participation in the study was obtained from legal representatives of all subjects.

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel V. Seredin
Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018, Russia; paul@phys.vsu.ru

Received: 15.06.2026 **Accepted:** 21.07.2026 **Published online:** 31.07.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.042

Copyright: © 2026 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/>).

Десневая жидкость — это локальная биосреда зубодесневой борозды, отражающая физико-химическое состояние тканей зубодесневого комплекса. Ее состав определяется белками, пептидами, компонентами воспалительного экссудата и продуктами тканевого ремоделирования, поэтому она удобна для спектроскопического анализа. В отличие от таргетных биохимических методов, ИК-Фурье (FTIR)-спектроскопия позволяет получать интегральную молекулярную характеристику малого объема образца и оценивать перераспределение вкладов различных конформационных состояний белковой составляющей образца [1–4].

Для детской стоматологии эта тема особенно актуальна, однако данные о локальных молекулярных маркерах десневой жидкости у детей пока ограничены. Современные обзоры показывают, что воспалительные изменения десны у детей и подростков встречаются часто, а на состояние тканей дополнительно влияют возраст, стадия прикуса, пубертатные изменения, уровень зубного налета и ортодонтическая нагрузка [5–7]. В связи с этим десневая жидкость представляет интерес как малоинвазивный аналитический субстрат, который можно отбирать повторно и соотносить с конкретным участком зубодесневого комплекса [1, 5–6]. Теоретически на такие спектральные сдвиги могут влиять микробные факторы, локальный протеолиз, окислительный стресс и воспалительно-ремоделирующие процессы, меняющие состав и конформационное состояние белков в десневой жидкости.

Особый интерес для анализа белковой составляющей представляет область полосы Амид III, чувствительная к вкладу α -спиральных, β -складчатых, β -поворотных и неупорядоченных структур. По сравнению с областями Амид I и Амид II, ее интерпретация в меньшей степени осложняется влиянием воды и водородно-связанного фона, что особенно важно при исследовании малых объемов водосодержащих биосред, к которым относится десневая жидкость [4, 8–10]. Вместе с тем для корректной трактовки спектров белковых систем в этой области необходим учет перекрытия ИК-полос, выбор схемы предварительной обработки и параметров деконволюции [4, 8–10]. Поэтому в сложных биосредах целесообразно рассматривать не отдельные пики как прямые маркеры, а интегральный спектральный профиль как отражение направленных изменений белковой составляющей [4, 8].

Дополнительным ограничением подобных исследований является небольшой объем выборки, что требует применения методов многомерного анализа, адаптированных к спектральным данным и ограниченному числу наблюдений. Ранее было показано, что многомерный анализ ИК-спектров десневой жидкости позволяет выявлять скрытые закономерности, связанные с клиническим статусом и индивидуальными особенностями пациента [11]. Это делает сочетание деконволюции полосы Амид III и многомерного статистического анализа перспективным подходом к изучению направленных изменений вторичной структуры белков в десневой жидкости [11].

Мы исходили из рабочей гипотезы, что при кариесе и воспалительных изменениях десны профиль полосы Амид III десневой жидкости у детей будет изменяться направленно за счет перераспределения спектрально-ассоциированных компонент, соответствующих различным элементам вторичной структуры белков. Целью настоящей работы было выявить такие направленные изменения спектрального профиля полосы Амид III и оценить

возможность их рассмотрения в качестве кандидатных спектральных признаков изменений белковой составляющей десневой жидкости.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования и характеристика выборки

В исследование включили 20 детей в возрасте 8–14 лет, у которых после стоматологического обследования выполняли забор десневой жидкости. Критерии включения: возраст 8–14 лет; наличие информированного добровольного согласия законных представителей; возможность проведения стандартного стоматологического обследования и забора десневой жидкости; отсутствие на момент обследования антибактериальной и иной терапии, способной существенно повлиять на состав исследуемой биосреды. Критерии исключения: иной возраст и несоответствие критериям включения. Исследование имело пилотный одноцентровый характер. Поскольку у части пациентов клинические факторы сочетались, исследование было ориентировано прежде всего на выявление направленности спектральных сдвигов, а не на строгую оценку независимого вклада каждого фактора.

Кариозный статус оценивали клинически с выделением групп без клинических признаков кариеса, с начальным кариесом и с множественным кариесом. Состояние десны характеризовали по наличию и степени выраженности воспалительных изменений как отсутствие клинически значимых изменений, воспалительные изменения легкой степени или воспалительные изменения средней степени. Сопутствующую соматическую патологию учитывали по данным анамнеза и медицинской документации. Для детального сопоставления спектральных профилей и их деконволюции были выделены четыре аналитические группы (табл.).

Отбор образцов десневой жидкости

Объектом исследования служила белковая составляющая десневой жидкости — сложной многокомпонентной биосреды, локально связанной с тканями зубодесневого интерфейса. Забор образцов проводили на кафедре детской стоматологии с ортодонтией Воронежского государственного медицинского университета имени Н. Н. Бурденко (Воронеж, Россия). Десневую жидкость отбирали в утренние часы без предварительной стимуляции с использованием микрокапилляров. Такой режим отбора минимизировал влияние циркадных колебаний и обеспечивал сопоставимость условий регистрации спектров [12]. После отбора образцы помещали в стерильные контейнеры и хранили при температуре 1–2 °C до спектроскопического анализа в рамках единого преаналитического режима.

ИК-Фурье-спектроскопия

ИК-спектры регистрировали методом синхротронной ИК-Фурье-спектроскопии с использованием вакуумированного спектрометра Bruker Vertex 80/v (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) в диапазоне 3800–700 см⁻¹. В качестве основной аналитической области рассматривали полосу Амид III, поскольку она позволяет анализировать конформационные особенности белковой составляющей при меньшей методической зависимости от водного

Таблица. Описание групп образцов десневой жидкости, включенных в деконволюцию спектральных профилей Амид III

Внутренний код аналитической группы	Пол	Возрастная подгруппа	Стадия кариеса	Воспалительные изменения десны	Сопутствующая патология
ЖМЗЗЗ	Ж	Младшая (М)	Здоровый (З)	Клинически значимые изменения не выявлены (З)	Отсутствует (З)
ЖПКЗЗ	Ж	Подростковая (П)	Начальный кариес (К)	Клинически значимые изменения не выявлены (З)	Отсутствует (З)
ЖПКСО	Ж	Подростковая (П)	Начальный кариес (К)	Воспалительные изменения средней степени (С)	Онкологическое заболевание (О)
МПМЛЖ	М	Подростковая (П)	Множественный кариес (М)	Воспалительные изменения легкой степени (Л)	Заболевание ЖКТ (Ж)

Примечание: Внутренний код аналитической группы включает пять символов: 1-й — пол, 2-й — возрастную подгруппу, 3-й — кариозный статус, 4-й — состояние десны, 5-й — сопутствующую патологию.

фона по сравнению с областями Амид I и Амид II [4, 8–10]. В исходном экспериментальном цикле применяли стандартные параметры регистрации: спектральное разрешение 4 см^{-1} , аподизацию Blackman–Harris 3-Term, фазовую коррекцию Mertz и коэффициент zero filling, равный 2. Содержимое каждого образца разделяли на десять порций, для каждой из которых регистрировали отдельный ИК-спектр; последующую характеристику спектрального профиля проводили по усредненным данным.

Предварительная обработка спектров и деконволюция

Первичная обработка ИК-спектров включала сглаживание кривых полиномом Савицкого–Голея второго порядка при размере окна 25 точек. Коррекцию базовой линии выполняли методом асимметричных наименьших квадратов в диапазоне $4000\text{--}500\text{ см}^{-1}$ при пороговом значении 0,01 и факторе асимметрии около 0,001. Параметры предобработки подбирали так, чтобы уменьшить артефакты сглаживания и коррекции базовой линии при сохранении чувствительности к изменениям формы полосы Амид III.

Для количественного описания профиля полосы Амид III выполняли деконволюцию с выделением компонент, соотносимых с α -спиральными, β -складчатыми, β -поворотными и неупорядоченными конформациями. Для аппроксимации использовали гауссовы функции. Предварительный поиск центров тяжести и ширины полос на полувысоте проводили по вторым и четвертым производным сглаженных спектров. Дальнейшее моделирование выполняли в программе Fityk v.1.3.1 (разработчик М. Wojdyr, Польша) с использованием алгоритма Левенберга–Марквардта. Для сопоставимости результатов во всех образцах сохраняли одинаковое число компонент. При моделировании использовали box-ограничения: для положений максимумов $\pm 2\text{ см}^{-1}$, для значений FWHM — $7\text{--}10\text{ см}^{-1}$. Критерием завершения аппроксимации служило наилучшее соответствие между теоретической и экспериментальной кривыми по критерию χ^2 . Полученные компоненты рассматривали как спектрально-ассоциированные вклады, а не как прямое абсолютное измерение содержания соответствующих вторичных структур [4, 8–10]. Соотнесение компонент I–XII с элементами вторичной структуры белков проводили на основании ранее опубликованных данных по интерпретации полосы Амид III и диапазонов максимумов соответствующих ИК-полос [4, 8–10]. Выбранные box-ограничения задавали в пределах, обеспечивавших устойчивость аппроксимации и соответствие литературным диапазонам положений максимумов и ширины полос для

области Амид III [4, 8–10]. Одинаковое число компонент, единые box-ограничения и применение одинаковой схемы аппроксимации во всех образцах использовали для повышения воспроизводимости и сопоставимости результатов деконволюции.

Многомерный и статистический анализ

После предварительной обработки массив спектральных данных анализировали методом главных компонент для оценки взаимного расположения образцов в многомерном пространстве и интерпретации связей между спектральной вариабельностью и клиническими факторами. В качестве количественных переменных использовали интенсивности спектров в области полосы Амид III, а характеристики пациентов рассматривали как категориальные признаки, применяемые на этапе интерпретации. Для анализа использовали пакет FactoMineR в среде R, а для визуализации — пакет factoextra. На этом этапе определяли, какие клинические факторы в наибольшей степени связаны с основными направлениями спектральной вариабельности, и оценивали близость образцов в пространстве главных компонент. На этапе интерпретации дополнительно оценивали, как уровни категориальных клинических признаков соотносятся с положением образцов и основными направлениями спектральной вариабельности, выявленными методом главных компонент. Категориальные клинические признаки не включали в модель как независимые ковариаты; их использовали для клинической интерпретации распределения образцов в пространстве главных компонент, что соответствовало пилотному дизайну исследования.

На следующем этапе после выделения ключевых факторов вариабельности отбирали образцы для дальнейшей деконволюции спектральных профилей и проводили исследовательские попарные сравнения. Для этого использовали пакет BSDA и функцию tsum.test с поправкой Бонферрони на множественные сравнения. Анализ выполняли при уровне значимости 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Спектральный профиль полосы Амид III

В области полосы Амид III образцы десневой жидкости характеризовались сложным многокомпонентным контуром, формируемым перекрывающимися полосами различной конформационной принадлежности (рис.1). Поэтому интегральная интенсивность была информативна лишь частично, тогда как более содержательным параметром оказалось перераспределение вкладов

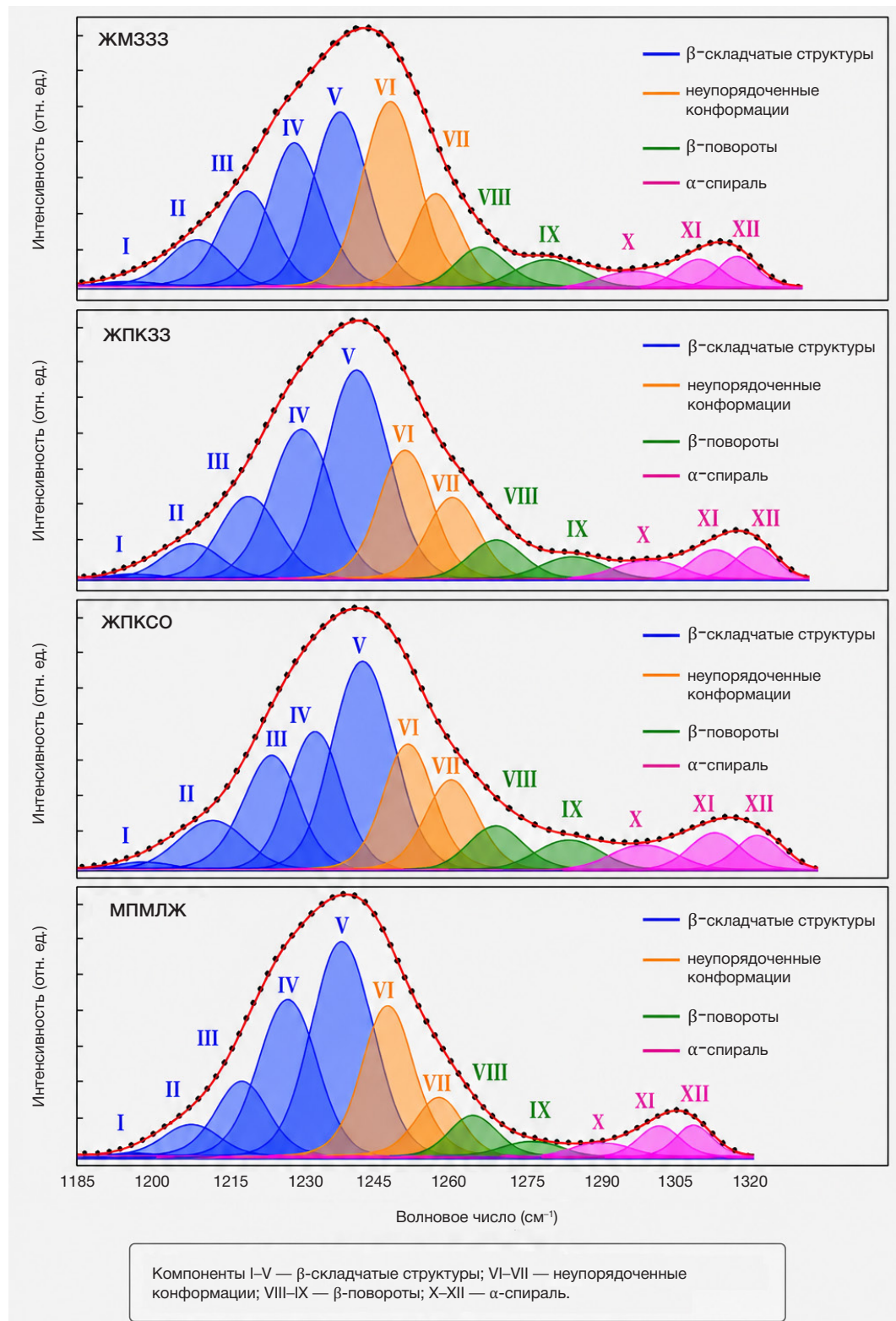


Рис. 1. Деконволюция спектрального профиля полосы Амид III образцов десневой жидкости у детей 8–14 лет с различным клиническим статусом. Внутренние коды образцов представлены в таблице. Компоненты I–V в спектральном профиле соотношены с β -складчатыми структурами, VI–VII — с неупорядоченными конформациями, VIII–IX — с β -поворотами, X–XII — с α -спиральными компонентами

отдельных спектральных компонент внутри общего профиля. Основной вклад в интегральную интенсивность вносили компоненты, соотносимые с β -складчатыми структурами и неупорядоченными конформациями; вклад α -спиральных компонент был менее выражен [8–10]. По данным суммарной оценки основных элементов вторичной структуры (рис. 2), во всех четырех аналитических группах

вклад β -складчатых компонент превышал 50%, вклад неупорядоченных конформаций составлял примерно 21–31%, тогда как вклад β -поворотов и α -спиральных компонент оставался менее 10–11%. Ключевые клинические характеристики аналитических групп приведены в таблице, а типичный профиль деконволюции — на рис. 1. На рис. 2 столбцы отражают средние значения суммарных вкладов,

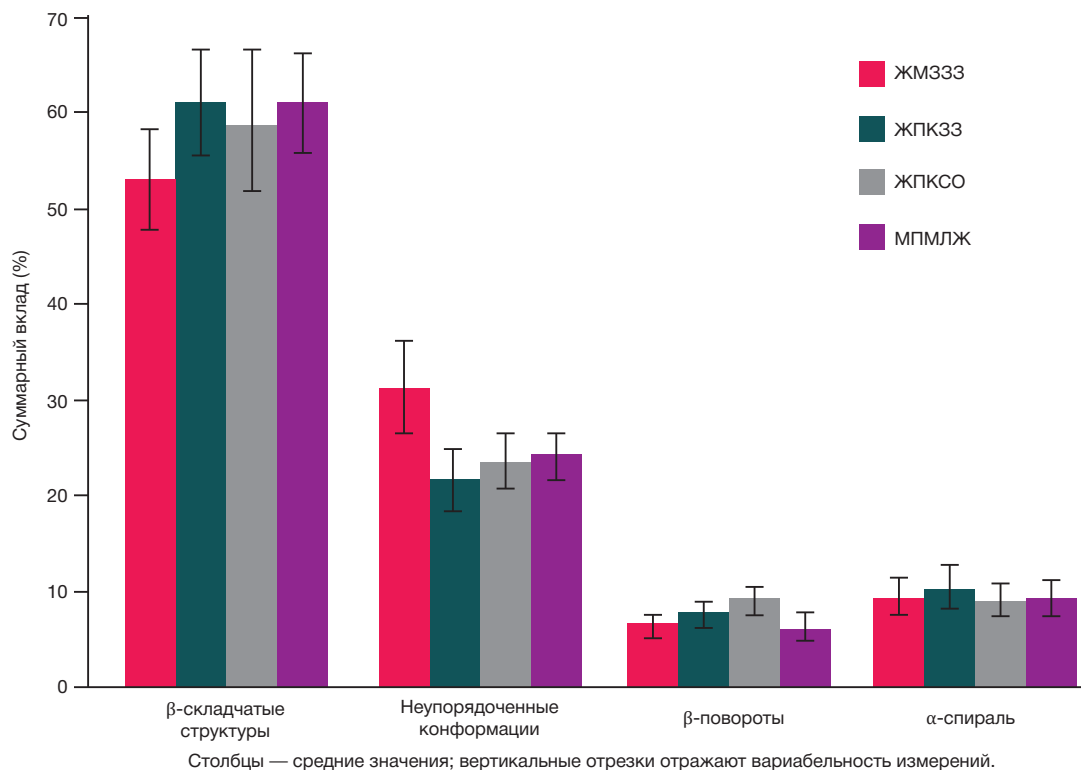


Рис. 2. Относительный вклад основных элементов вторичной структуры белков десневой жидкости в интегральный профиль полосы Амид III

а вертикальные отрезки — вариабельность измерений. Данные многомерного анализа использовали для отбора четырех аналитических групп; выявленная спектральная неоднородность образцов в целом согласовывалась с направленностью сдвигов, установленной при последующей деконволюции полосы Амид III. В пространстве первых главных компонент наблюдалось частичное разграничение аналитических групп, что в целом не противоречило последующим различиям в суммарных вкладах β-складчатых компонент и β-поворотов.

Внутренние коды образцов представлены в таблице. Компоненты I–V в спектральном профиле соотнесены с β-складчатыми структурами, VI–VII — с неупорядоченными конформациями, VIII–IX — с β-поворотами, X–XII — с α-спиральными компонентами. Такое распределение также вынесено в поясняющий блок рис. 1 для облегчения интерпретации графического материала.

Спектральные сдвиги при кариесе

Наиболее устойчивой особенностью в пилотной выборке было направленное увеличение относительного вклада компонент, ассоциированных с β-складчатыми структурами, в образцах детей с кариесом. Суммарный вклад β-складчатых компонент в группах с кариесом достигал примерно 59–61% против около 53% в группе без клинически значимых стоматологических изменений (рис. 2). Этот сдвиг сохранял одно и то же направление при разных сочетаниях сопутствующих клинических признаков, хотя его величина менялась от сравнения к сравнению. В рамках настоящей работы такой результат корректно рассматривать не как диагностический критерий, а как кандидатный спектральный признак изменений белковой составляющей десневой жидкости [11, 13–14].

По своему направлению это наблюдение согласуется с данными литературы по ИК-Фурье-спектроскопии в

области полосы Амид III у взрослых, где β-складчатые компоненты также описаны как наиболее устойчивый сдвиг, ассоциированный с кариесом [11, 13–14]. Однако совпадение направления не означает эквивалентности выводов: взрослая когорта и детская выборка различаются по возрасту, клиническому контексту и набору смешивающих факторов. Следовательно, речь идет о предварительной межисследовательской согласованности, а не о полноценной внешней репликации.

Спектральные сдвиги при воспалительных изменениях тканей пародонта

При воспалительных изменениях десны наблюдалась тенденция к уменьшению вклада β-поворотов и относительному увеличению неупорядоченных конформаций. В исследовательском наборе доля β-поворотов оставалась низкой и не превышала примерно 10%, тогда как вклад неупорядоченных конформаций находился в диапазоне около 21–24% для групп с воспалительными изменениями десны. С физико-химической точки зрения такой сдвиг может отражать изменение состава белковой составляющей, усиление протеолитической активности и повышение доли структурно менее упорядоченных белковых состояний в локальной воспалительно-ремоделирующей среде [2–3, 15].

Международные данные по анализу состава десневой жидкости с использованием методов молекулярной идентификации поддерживают эту общую логику: при развитии заболеваний пародонта образцы могут различаться по молекулярному профилю, а значимыми оказываются изменения цитокинов, металлопротеиназ и матричных белков [2–3, 15–16]. В настоящем исследовании выявленные спектральные сдвиги следует трактовать как интегральный сигнал воспалительно-ремоделирующей среды, а не как характеристику отдельных таргетных белков или белковых панелей.

Сопутствующая соматическая патология

У части детей с сопутствующей соматической патологией регистрировалось уменьшение вклада α -спиральных компонент. Биологически такой сдвиг возможен, поскольку для различных заболеваний и состояний стресса в белковых образцах описывали соотношение типа « α -спираль / β -складчатая структура» [4, 17–18]. Однако с учетом малого объема выборки и сочетания клинических факторов этот результат следует трактовать как наблюдательную тенденцию, а не как доказанный самостоятельный эффект сопутствующей патологии. В контексте детской слюнной жидкости ИК-Фурье-анализ следует рассматривать как интегральный метод молекулярного профилирования, а не как замену таргетным белковым панелям [4, 17–18]. Распределение вкладов основных элементов вторичной структуры белков представлено на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные свидетельствуют о том, что профиль полосы Амид III в слюнной жидкости следует рассматривать прежде всего как интегральную спектральную характеристику сложной белковой смеси, а не как прямое количественное измерение содержания отдельных вторичных структур. Поэтому интерпретация результатов должна учитывать ограничения, связанные с перекрыванием полос, схемой предварительной обработки и используемой моделью деконволюции [4, 8–10].

Направленное увеличение вклада β -складчатых компонент при кариесе согласуется с ранее описанными в работах по ИК-спектроскопии оральных биосред и расширяет эти результаты на педиатрическую выборку [11, 13–14]. Такая тенденция может отражать изменение соотношения более упорядоченных и менее упорядоченных белковых состояний в условиях локального кариозного процесса. В свою очередь, тенденция к снижению вклада β -поворотов и относительному росту неупорядоченных конформаций при воспалительных изменениях десны биологически правдоподобна и соответствует современным представлениям о перестройке молекулярного профиля слюнной жидкости в воспалительно-ремоделирующей среде [1–3, 15–16].

Таким образом, многомерный анализ и деконволюция спектральной полосы Амид III в настоящей работе выполняли взаимодополняющие функции: PCA использовали для выявления общей спектральной

неоднородности и отбора аналитических групп, тогда как деконволюция позволяла интерпретировать эту вариабельность через перераспределение вкладов компонент полосы Амид III. Такое согласование двух подходов повышает доказательность выявленных направленных сдвигов, хотя в силу пилотного дизайна не заменяет их дальнейшей клинической проверки.

Ограничения исследования

Интерпретация выявленных сдвигов ограничена пилотным объемом выборки, клинической неоднородностью наблюдений и зависимостью результатов деконволюции от алгоритмов предварительной обработки спектров [4, 8]. Кроме того, в детской выборке на состав слюнной жидкости потенциально влияют возраст, стадия прикуса, гигиенический статус, ортодонтическая нагрузка и пубертатные изменения [5–7]. Дополнительными источниками вариабельности могли быть особенности преаналитического этапа, в том числе объем материала и временной интервал между забором и регистрацией спектров. Наконец, в настоящем пилотном исследовании сопутствующую соматическую патологию не анализировали как самостоятельный независимый фактор. Поэтому обнаруженные особенности следует рассматривать как гипотезо-генерирующие и требующие дальнейшей валидации на расширенном клинически стратифицированном материале. Дополнительным ограничением является то, что кариозный статус и выраженность воспалительных изменений десны в настоящей пилотной работе описывали исследовательской клинической стратификацией, а не развернутой индексной оценкой, что должно учитываться при интерпретации результатов.

ВЫВОДЫ

Анализ полосы Амид III слюнной жидкости у детей 8–14 лет позволил выявить различия ИК-спектрального профиля белковой составляющей в зависимости от стоматологического статуса. В пилотной выборке кариес ассоциировался с увеличением вклада β -складчатых структур, а воспалительные изменения десны — с тенденцией к росту неупорядоченных конформаций и снижению вклада β -поворотов. Таким образом, анализ ИК-спектральной полосы Амид III может быть полезен как исследовательский подход для оценки молекулярных изменений в слюнной жидкости, однако его клиническая значимость требует дальнейшего подтверждения.

Литература

1. Cuevas-González MV, Cuevas-González JC, Espinosa-Cristóbal LF, Tovar-Carrillo KL, Saucedo-Acuña RA, García-Calderón AG, et al. The potential of gingival crevicular fluid as a tool for molecular diagnosis: a systematic review. *Biomed Res Int.* 2024; 2024: 5560866. DOI: 10.1155/2024/5560866.
2. Buduneli N, Bıyıkoglu B, Kinane DF. Utility of gingival crevicular fluid components for periodontal diagnosis. *Periodontol* 2000. 2024; 95 (1): 156–75. DOI: 10.1111/prd.12595.
3. Torres A, Michea MA, Végvári Á, Arce M, Pérez V, Alcota M, et al. A multi-platform analysis of human gingival crevicular fluid reveals ferroptosis as a relevant regulated cell death mechanism during the clinical progression of periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2024; 16 (1): 43. DOI: 10.1038/s41368-024-00306-y.
4. Tintor Đ, Ninković K, Milošević J, Polović NĐ. Gaining insight into protein structure via ATR-FTIR spectroscopy. *Vib Spectrosc.* 2024; 134: 103726. DOI: 10.1016/j.vibspec.2024.103726.
5. American Academy of Pediatric Dentistry. Periodontal conditions in pediatric dental patients. In: *The Reference Manual of Pediatric Dentistry*. Chicago (IL): American Academy of Pediatric Dentistry, 2025; p. 527–44.
6. Deng Q, Wong HM, Peng S. Salivary and gingival crevicular fluid biomarkers of periodontal health and/or obesity among children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Heliyon.* 2024; 10 (1): e23782. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23782.
7. Iwamoto Y, Mitsuhashi C, Ikeda S, Ito Y, Hamaguchi S, Tabata E, et al. Development of a novel method to evaluate gingivitis in

- children by combining rapid saliva test systems. *Sci Rep.* 2025; 15: 41033. DOI: 10.1038/s41598-025-24982-w.
8. De Meutter J, Goormaghtigh E. Searching for a better match between protein secondary structure definitions and protein FTIR spectra. *Anal Chem.* 2021; 93 (3): 1561–8. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03943.
 9. Cai S, Singh BR. Identification of beta-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophys Chem.* 1999; 80 (1): 7–20. DOI: 10.1016/S0301-4622(99)00060-5.
 10. Stani C, Vaccari L, Mitri E, Birarda G. FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: new insight into the amide III band. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020; 229: 118006. DOI: 10.1016/j.saa.2019.118006.
 11. Seredin P, Litvinova T, Ippolitov Y, Goloshchapov D, Peshkov Y, Kashkarov V, et al. A study of the association between primary oral pathologies (dental caries and periodontal diseases) using synchrotron molecular FTIR spectroscopy in view of the patient's personalized clinical picture (demographics and anamnesis). *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (12): 6395. DOI: 10.3390/ijms25126395.
 12. Papagerakis P, Zheng L, Kim D, Said R, Ehler AA, Chung KKM, et al. Saliva and gingival crevicular fluid collection for biomarker screening. In: Papagerakis P, editor. *Odontogenesis: Methods and Protocols.* New York: Springer, 2019; p. 549–62. DOI: 10.1007/978-1-4939-9012-2_41.
 13. Seredin P, Goloshchapov D, Ippolitov Y, Vongsvivut J. Comparative analysis of dentine and gingival fluid molecular composition and protein conformations during development of dentine caries: a pilot study. *Vib Spectrosc.* 2020; 108: 103058. DOI: 10.1016/j.vibspec.2020.103058.
 14. Seredin P, Goloshchapov D, Ippolitov Y, Vongsvivut J. Spectroscopic signature of the pathological processes of carious dentine based on FTIR investigations of the oral biological fluids. *Biomed Opt Express.* 2019; 10 (8): 4050–8. DOI: 10.1364/BOE.10.004050.
 15. Teles F, Martin L, Patel M, Hu W, Bittinger K, Kallan MJ, et al. Gingival crevicular fluid biomarkers during periodontitis progression and after periodontal treatment. *J Clin Periodontol.* 2025; 52 (1): 40–55. DOI: 10.1111/jcpe.14061.
 16. Esberg A, Kindstedt E, Isehede C, Lindquist S, Holmlund A, Lundberg P. LIGHT protein: a novel gingival crevicular fluid biomarker associated with increased probing depth after periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 2024; 51 (7): 852–62. DOI: 10.1111/jcpe.13964.
 17. Portaccio M, d'Apuzzo F, Perillo L, Grassia V, Errico S, Lepore M. Infrared microspectroscopy characterization of gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. *J Mol Struct.* 2019; 1176: 847–54. DOI: 10.1016/j.molstruc.2018.09.013.
 18. Lepore M, Portaccio M, d'Apuzzo F, Nucci L, Grassia V, Annunziata M, et al. Rapid acquisition of gingival crevicular fluid FT-IR spectra for monitoring orthodontic treatments. In: 2024 IEEE Sensors Applications Symposium (SAS), 2024; p. 1–5. DOI: 10.1109/SAS60918.2024.10636387.

References

1. Cuevas-González MV, Cuevas-González JC, Espinosa-Cristóbal LF, Tovar-Carrillo KL, Saucedo-Acuña RA, García-Calderón AG, et al. The potential of gingival crevicular fluid as a tool for molecular diagnosis: a systematic review. *Biomed Res Int.* 2024; 2024: 5560866. DOI: 10.1155/2024/5560866.
2. Buduneli N, Bıyıkoglu B, Kinane DF. Utility of gingival crevicular fluid components for periodontal diagnosis. *Periodontol 2000.* 2024; 95 (1): 156–75. DOI: 10.1111/prd.12595.
3. Torres A, Michea MA, Végvári Á, Arce M, Pérez V, Alcota M, et al. A multi-platform analysis of human gingival crevicular fluid reveals ferroptosis as a relevant regulated cell death mechanism during the clinical progression of periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2024; 16 (1): 43. DOI: 10.1038/s41368-024-00306-y.
4. Tintor Đ, Ninković K, Milošević J, Polović NB. Gaining insight into protein structure via ATR-FTIR spectroscopy. *Vib Spectrosc.* 2024; 134: 103726. DOI: 10.1016/j.vibspec.2024.103726.
5. American Academy of Pediatric Dentistry. Periodontal conditions in pediatric dental patients. In: *The Reference Manual of Pediatric Dentistry.* Chicago (IL): American Academy of Pediatric Dentistry, 2025; p. 527–44.
6. Deng Q, Wong HM, Peng S. Salivary and gingival crevicular fluid biomarkers of periodontal health and/or obesity among children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Heliyon.* 2024; 10 (1): e23782. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23782.
7. Iwamoto Y, Mitsuhashi C, Ikeda S, Ito Y, Hamaguchi S, Tabata E, et al. Development of a novel method to evaluate gingivitis in children by combining rapid saliva test systems. *Sci Rep.* 2025; 15: 41033. DOI: 10.1038/s41598-025-24982-w.
8. De Meutter J, Goormaghtigh E. Searching for a better match between protein secondary structure definitions and protein FTIR spectra. *Anal Chem.* 2021; 93 (3): 1561–8. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03943.
9. Cai S, Singh BR. Identification of beta-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophys Chem.* 1999; 80 (1): 7–20. DOI: 10.1016/S0301-4622(99)00060-5.
10. Stani C, Vaccari L, Mitri E, Birarda G. FTIR investigation of the secondary structure of type I collagen: new insight into the amide III band. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2020; 229: 118006. DOI: 10.1016/j.saa.2019.118006.
11. Seredin P, Litvinova T, Ippolitov Y, Goloshchapov D, Peshkov Y, Kashkarov V, et al. A study of the association between primary oral pathologies (dental caries and periodontal diseases) using synchrotron molecular FTIR spectroscopy in view of the patient's personalized clinical picture (demographics and anamnesis). *Int J Mol Sci.* 2024; 25 (12): 6395. DOI: 10.3390/ijms25126395.
12. Papagerakis P, Zheng L, Kim D, Said R, Ehler AA, Chung KKM, et al. Saliva and gingival crevicular fluid collection for biomarker screening. In: Papagerakis P, editor. *Odontogenesis: Methods and Protocols.* New York: Springer, 2019; p. 549–62. DOI: 10.1007/978-1-4939-9012-2_41.
13. Seredin P, Goloshchapov D, Ippolitov Y, Vongsvivut J. Comparative analysis of dentine and gingival fluid molecular composition and protein conformations during development of dentine caries: a pilot study. *Vib Spectrosc.* 2020; 108: 103058. DOI: 10.1016/j.vibspec.2020.103058.
14. Seredin P, Goloshchapov D, Ippolitov Y, Vongsvivut J. Spectroscopic signature of the pathological processes of carious dentine based on FTIR investigations of the oral biological fluids. *Biomed Opt Express.* 2019; 10 (8): 4050–8. DOI: 10.1364/BOE.10.004050.
15. Teles F, Martin L, Patel M, Hu W, Bittinger K, Kallan MJ, et al. Gingival crevicular fluid biomarkers during periodontitis progression and after periodontal treatment. *J Clin Periodontol.* 2025; 52 (1): 40–55. DOI: 10.1111/jcpe.14061.
16. Esberg A, Kindstedt E, Isehede C, Lindquist S, Holmlund A, Lundberg P. LIGHT protein: a novel gingival crevicular fluid biomarker associated with increased probing depth after periodontal surgery. *J Clin Periodontol.* 2024; 51 (7): 852–62. DOI: 10.1111/jcpe.13964.
17. Portaccio M, d'Apuzzo F, Perillo L, Grassia V, Errico S, Lepore M. Infrared microspectroscopy characterization of gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. *J Mol Struct.* 2019; 1176: 847–54. DOI: 10.1016/j.molstruc.2018.09.013.
18. Lepore M, Portaccio M, d'Apuzzo F, Nucci L, Grassia V, Annunziata M, et al. Rapid acquisition of gingival crevicular fluid FT-IR spectra for monitoring orthodontic treatments. In: 2024 IEEE Sensors Applications Symposium (SAS), 2024; p. 1–5. DOI: 10.1109/SAS60918.2024.10636387.

ХРОНИЧЕСКОЕ УТОМЛЕНИЕ У СИБЛИНГОВ ДЕТЕЙ С ОНКОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ: САМООТЧЕТЫ ДЕТЕЙ И НАБЛЮДЕНИЯ РОДИТЕЛЕЙ

Е. Н. Лихоманова^{1,2}✉, О. В. Шевалдова¹, А. В. Ковалева¹

¹ Федеральный исследовательский центр оригинальных и перспективных биомедицинских и фармацевтических технологий, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва, Россия

Психологические последствия лечения онкологического заболевания ребенка затрагивают всех членов семьи, в частности здоровых братьев и сестер (сиблингов). Известно о снижении качества их жизни, самооценки, страхе смерти и одиночества. Цель исследования — сравнить уровень хронического утомления у сиблингов детей с онкологическими заболеваниями и у детей из семей без тяжелобольных близких в зависимости от информанта: по данным самооценки ребенка и наблюдения родителя. В поперечном контролируемом исследовании заполняли опросник «Степень хронического утомления» 113 диад «родитель–ребенок»: 65 пар, где есть второй больной ребенок (группа сиблингов), и 48 контрольных пар. Группы были сопоставимы по полу и возрасту детей (7–11 лет). Линейными смешанными моделями выявлено значимое взаимодействие «группа × информант» ($p < 0,001$). В контроле родители занижали уровень утомления в сравнении с самооценкой детей (–10 баллов), а у сиблингов родительские оценки были сопоставимы с детскими или превышали их по большинству шкал, кроме социальной сферы ($\Delta = 2$ балла, $p < 0,001$). Внутренняя корреляция в группе сиблингов оказалась сильнее ($r = 0,73$, $p < 0,001$), чем в контрольной ($r = 0,34$, $p = 0,019$). Межгрупповые самооценки детей по общему баллу не различались, но у сиблингов выраженность физиологического дискомфорта была выше ($p = 0,037$), а снижение общего самочувствия, когнитивного дискомфорта и нарушения в социальной сфере — ниже ($p < 0,001$). Вывод: в семьях с тяжелобольным ребенком родители систематически завышают уровень утомления здорового ребенка, а сами дети оценивают свое состояние иначе. Это расхождение необходимо учитывать при медико-психологическом сопровождении семей.

Ключевые слова: хроническое утомление, сиблинги, родители, семейный стресс, детская онкология, реабилитация

Финансирование: грант РНФ № 25-25-00898 «Психофизиологические индикаторы адаптации здоровых сиблингов (братьев и сестер) в семьях детей с онкологическими заболеваниями».

Благодарности: А. Ф. Карелину за возможность проведения исследования на базе ЛРНЦ «Русское поле» НМИЦ ДГОИ имени Д. Рогачева и А. А. Девятериковой за экспертную оценку рукописи.

Вклад авторов: Е. Н. Лихоманова — концептуализация, методология, проведение исследования, обработка данных, редактирование; О. В. Шевалдова — статистический анализ, подготовка иллюстраций, написание рукописи; А. В. Ковалева — руководство проектом, администрирование, редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «НИИ нормальной физиологии имени П. К. Анохина» (протокол № 18/1 от 15 февраля 2023 г.), а также этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева» (протокол № 8э/16-17 от 27 октября 2017 г.). Родители детей подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Николаевна Лихоманова
ул. Балтийская, д. 8, г. Москва, 125315; likhomanova_en@academpharm.ru

Статья получена: 03.06.2026 **Статья принята к печати:** 29.06.2026 **Опубликована онлайн:** 18.07.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.040

Авторские права: © 2026 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/>).

CHRONIC FATIGUE IN SIBLINGS OF PEDIATRIC CANCER SURVIVORS: CHILDREN'S SELF-REPORTS AND PARENTS' PROXY-REPORTS

Likhomanova EN^{1,2}✉, Shevaldova OV¹, Kovaleva AV¹

¹ Federal Research Center for Innovator and Emerging Biomedical and Pharmaceutical Technologies, Moscow, Russia

² Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

The psychological effects of childhood cancer and its treatment extend to all family members, particularly healthy siblings, of the affected child. Previous studies have reported reduced quality of life and self-esteem, as well as increased death anxiety and loneliness, among these children. This study aimed to compare the severity of chronic fatigue in siblings of children with cancer and in children from families without a seriously ill family member, with consideration of the informant: the child's self-report or the parent's proxy report. A total of 113 parent–child dyads participated in this controlled cross-sectional study. The sibling group comprised 65 healthy children whose brother or sister had cancer, and the control group comprised 48 children from families without a seriously ill family member. The groups were matched for the children's sex and age (7–11 years). Chronic fatigue was assessed using the Chronic Fatigue Severity Questionnaire. Linear mixed-effects models revealed a significant group × informant interaction ($p < 0.001$). In the control group, parents rated fatigue severity lower ($\Delta = -10$ points) than did the children themselves. In the sibling group, parental ratings were comparable to or higher than the children's self-ratings ($\Delta = 2$ points, $p < 0.001$). Parent–child agreement was stronger in the sibling group ($r = 0.73$, $p < 0.001$) than in the control group ($r = 0.34$, $p = 0.019$). No between-group differences were found in the total fatigue scores based on the children's self-reports. Siblings reported greater physiological discomfort ($p = 0.037$), but less decline in general well-being, cognitive comfort, and social functioning than controls (all $p < 0.001$). The results suggest that in families of children with cancer, parental assessments of a healthy child's fatigue differ from the child's own perception of their condition. Parents tend to rate fatigue as more severe than do the children themselves, whereas the opposite pattern is observed in control families. This informant discrepancy should be considered when assessing the well-being of healthy siblings and when providing psychological support to families affected by childhood cancer.

Keywords: chronic fatigue, siblings, parents, family stress, pediatric cancer, rehabilitation

Funding: RSF grant No. 25-25-00898 "Psycho-Physiological Indicators of Healthy Siblings' (Brothers' and Sisters') Adaptation in Families of Children With Cancer".

Acknowledgments: the authors express their gratitude to A.F. Karelin for the opportunity to conduct the study at the Russkoye Pole Treatment and Rehabilitation Research Center (Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology) and A.A. Devyaterikova for the expert opinion about the manuscript.

Author contribution: Likhomanova EN — conceptualization, methodology, research procedure, data processing, manuscript editing; Shevaldova OV — statistical analysis, preparation of illustrations for the article, manuscript writing; Kovaleva AV — project management, administration, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Anokhin Research Institute of Normal Physiology (protocol No. 18/1 dated February 15, 2023), as well as the Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (protocol No. 8э/16-17 dated October 27, 2017). The children's parents submitted the informed consent to take part in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena N. Likhomanova
Baltiyskaya, 8, Moscow, 125315; likhomanova_en@academpharm.ru

Received: 03.06.2026 **Accepted:** 29.06.2026 **Published online:** 18.07.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.040

Copyright: © 2026 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/>).

Злокачественные новообразования (ЗНО) занимают ведущее место среди причин детской смертности. В России в 2024 г. в возрасте 0–17 лет ЗНО были зарегистрированы у 0,013% населения (12,7 случаев на 100 тыс. человек), из них 32,4% были I–II стадии, пик заболевания приходился на возраст до 4 лет [1], мировая заболеваемость в 2022 г. превысила 211 000 случаев в год [2]. Российские популяционные исследования отмечают устойчивый рост выживаемости детей с онкологическими заболеваниями с 82,4% (2000 г.) до 89,0% (2021 г.) [3], в отдельных нозологиях достигая 95% [4]. В связи с этим фокус внимания исследователей и клиницистов смещается на качество дальнейшей жизни как самого пациента, так и его семьи [5].

Последствия онкологического заболевания ребенка затрагивают каждого члена семьи. Меняются привычный уклад и распределение обязанностей, нередко снижается уровень семейного дохода [6–9]. Особое место в этой ситуации занимают здоровые братья и сестры больного ребенка — сиблинги. Их трудности нередко оказываются незамеченными: родители, внимание которых направлено на больного ребенка, не могут в полной мере отслеживать состояние остальных детей, а клиницисты, как правило, с ними не работают [10, 11]. У большинства сиблингов средние уровни тревоги и депрессии не превышают возрастных норм, однако заметная часть из них страдает от симптомов посттравматического стресса, снижения качества жизни и школьных трудностей [10]. По результатам исследований русскоязычных авторов, в группе сиблингов распространены сниженная самооценка, страх смерти и одиночества, аутоагрессия, тревожность [12, 13]. Среди соматических проблем у сиблингов зафиксирована более высокая частота жалоб на боли, проблемы со сном и питанием [14], повышенная частота обращений в отделение неотложной помощи [15], что может отражать аллоstaticкую нагрузку — стойкие физиологические изменения, вызванные хроническим стрессом [16]. На большой когорте семей с тяжелообольными детьми было установлено, что здоровые члены таких семей намного чаще обращаются за медицинской помощью вне зависимости от пола [5].

Хроническое повышенное чувство усталости выступает как одно из закономерных проявлений такого накопленного напряжения [5, 15]. В настоящей работе усталость рассматривается не как клинический диагноз, а как субъективное ощущение сниженных сил — устойчивое переживание, которое дети способны описать самостоятельно. Утомление может отражаться на собственном физическом состоянии, эмоциональном фоне, когнитивном функционировании и социальной мотивации. Надежность подобных самооценок у детей школьного возраста, начиная примерно с 7–8 лет, подтверждена в многочисленных исследованиях [17, 18].

Наряду с самооценкой ребенка в клинической практике и научных исследованиях традиционно используют оценку родителя — его представление о состоянии своего ребенка. Сравнение двух источников информации составляет отдельную научную задачу. В работах, посвященных детям, проходящим лечение по поводу онкологических заболеваний, показано, что родители, как правило, систематически превышают детские самооценки. В частности, в многоцентровом исследовании в 2020 г. родительские оценки усталости оказывались в среднем на 13,7 балла выше, чем оценки самих детей, причем собственный уровень усталости родителя дополнительно усиливал это расхождение [17]. На русский язык был

переведен и адаптирован опросник для оценки усталости у детей 7–17 лет с онкологическими диагнозами [19]. Шкала опросника включает две оценки: самооценку ребенка и оценку родителя по данным его наблюдений. Вопрос о том, как соотносятся оценки родителей и детей в семьях, где у болеющего ребенка есть здоровые сиблинги, в научной литературе практически не рассматривался. Между тем родители, которые находятся в состоянии хронического стресса, чье внимание сосредоточено на уходе за болеющим ребенком и оценке его физического состояния, могут быть чувствительны к различным физическим симптомам своих здоровых детей.

Настоящая работа посвящена изучению уровня хронического утомления у сиблингов детей с онкологическими заболеваниями в сравнении со здоровыми детьми, не имеющими тяжелообольных братьев и сестер. Анализ проводили на основе двух источников — самооценки ребенка и оценки родителя, с изучением характера и направленности расхождений между ними в зависимости от группы. Гипотеза исследования — уровень хронического утомления у сиблингов детей с онкологическими заболеваниями значительно отличается от уровня утомления у детей из семей без тяжелообольных близких, причем характер этих различий может зависеть от источника информации (самооценка ребенка vs. оценка родителя). Цель исследования — сравнить уровень хронического утомления у сиблингов детей с онкологическими заболеваниями и у детей из семей без тяжелообольных близких в зависимости от информанта: по данным самооценки ребенка и наблюдения родителя.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 113 диад «родитель–ребенок», сформированных в две группы. В роли «родителя» выступали лишь матери. Группу сиблингов детей с онкологическими заболеваниями (далее «сиблинги») составили 65 диад, в семье которых воспитывается ребенок с онкологическим заболеванием, находящийся на динамическом наблюдении. Среди сиблингов относительно пациента было: четыре разнояцевых близнеца, 29 младших детей и 31 старший ребенок. Пол сиблинга совпадал с полом пациента в 32 случаях и не совпадал в 33. Медиана разницы в возрасте с пациентом составила 3,11 года [3, 10; 4, 48]. Максимально в семьях этой группы было 8 детей. Многодетными (трое и более детей) в группе сиблингов было 24 семьи (37%). Критерии включения для сиблингов: проживание в семье до момента постановки диагноза онкологическому пациенту и не менее года после него; отсутствие острых и хронических заболеваний в анамнезе и на момент обследования (включая период 14 дней до начала исследования); отсутствие приема любых лекарственных препаратов; свободное владение русским языком.

Группу контроля составили 48 диад, в которых обследуемый ребенок: здоров; не принимает какие-либо медикаментозные препараты; свободно владеет русским языком; не имеет близких родственников с каким-либо жизнеугрожающим заболеванием. Среди них было 18 старших, трое средних, 10 младших и 17 единственных детей (близнецов не было). У родителей группы контроля максимум было трое детей, многодетных семей было лишь пять (12,5%), из них в трех семьях (60%) старшие дети были уже совершеннолетними и жили отдельно.

Группы были сопоставимы по возрасту ($M = 9,65 [8,36–11,0]$ лет в группе контроля и $M = 9,56 [8,59–10,9]$ лет

Таблица 1. Субшкалы опросника «Степень хронического утомления» и принятые сокращения

Полное название субшкалы	Сокращение, используемое в тексте	Показатели надежности
Симптомы физиологического дискомфорта	Физиологический дискомфорт	$\alpha = 0,756$ $\omega = 0,786$
Снижение общего самочувствия и когнитивный дискомфорт	Снижение общего самочувствия	$\alpha = 0,710$ $\omega = 0,726$
Нарушения в эмоционально-аффективной сфере	Нарушения в эмоциональной сфере	$\alpha = 0,813$ $\omega = 0,817$
Снижение мотивации и изменения в сфере социального общения	Нарушения в социальной сфере	$\alpha = 0,738$ $\omega = 0,742$
Общий балл (индекс хронического утомления, ИХРУ)	Общий балл / ИХРУ	$\alpha = 0,847$ $\omega = 0,848$

в группе сиблингов; $p = 0,454$), полу (50,0 и 52,3% девочек соответственно; $p = 0,788$). По статусу многодетности группы сопоставимы не были (точный критерий Фишера; $p = 0,005$).

Для оценки субъективных представлений об уровне хронического утомления использовали стандартизированный опросник «Степень хронического утомления» [20]. Методика состоит из 36 пунктов, каждый из которых включает оценку по трехбалльной шкале (согласие с утверждением выражено однозначно, неоднозначно или отсутствует вовсе). Суммарный балл представляет собой индекс хронического утомления (ИХРУ) и позволяет оценить степень выраженности состояния: отсутствие признаков утомления, начальная степень, выраженная степень, высокая степень хронического утомления и астенический синдром (переход в область патологических состояний).

Помимо ИХРУ, опросник включает еще четыре субшкалы, характеризующие проявления хронического утомления в различных сферах жизни. Поскольку число пунктов в субшкалах неравномерно, авторы рекомендуют пересчитывать их в процентное выражение для корректного межшкального сравнения. Оригинальная версия опросника предназначалась для исследования взрослых людей, поэтому была проведена его адаптация для детского возраста: лексемы с корнем «работ» были заменены лексическими эквивалентами учебной деятельности: «учеба» (№ 12, 28), «учиться» (№ 21, 25) и «школа» (№ 33). Оценка внутренней согласованности (альфа (α) Кронбаха и омега (ω) Макдональда) подтвердила психометрическую пригодность модифицированной версии методики (согласно общепринятому порогу $\alpha, \omega \geq 0,7$ [21]). Сокращенные обозначения субшкал, используемые далее в статье, а также показатели их надежности представлены в табл. 1.

Исследование проведено на русском языке и реализовано на онлайн-платформе. Сбор данных среди матерей осуществлялся дистанционно: они заполняли

анкету в удобных для них месте и времени. Дети заполняли опросник очно в присутствии медицинского психолога на предоставленном компьютере. Заполнение опросника ребенком происходило либо самостоятельно, либо в форме полуструктурированного интервью, при котором специалист зачитывал вопросы вслух, помогал с интерпретацией инструкций и фиксировал варианты ответов со слов ребенка. Таким образом, по каждой диаде получали две независимые оценки состояния каждого ребенка — самооценку и родительскую оценку. Кроме того, участники отвечали на анкетные вопросы о частоте заболеваний (ОРВИ) в течение года, а также о регулярных занятиях спортом, музыкой и танцами.

Статистическая обработка данных выполнена в программе Jamovi версии 2.3.28 (The jamovi project, Австралия). Количественные переменные описывали медианой (Me) и межквартильным размахом [Q_1 – Q_3]; категориальные — абсолютными и относительными частотами (n , %). Для сравнения двух независимых групп по количественным показателям применяли критерий Манна–Уитни, для трех и более независимых групп — критерий Краскела–Уоллиса; для категориальных переменных — критерий χ^2 Пирсона или точный критерий Фишера при наличии ожидаемых частот менее 5.

Основной метод анализа — линейные смешанные модели (Linear Mixed Models, LMM) с оценкой параметров методом REML (Restricted Maximum Likelihood). Вложенная структура данных учитывалась за счет включения случайного эффекта участника (random intercept по идентификатору диады), что позволило корректно моделировать зависимость между оценками ребенка и родителя внутри одной диады. В качестве фиксированных эффектов в модель включали: группу (контроль/сиблинг), информанта (ребенок/родитель) и их взаимодействие (группа $\times$ информант). В число ковариат входили пол ребенка, частота острых респираторных заболеваний и наличие регулярных физических нагрузок (занятия спортом и танцами).

Таблица 2. Социально-демографическая и клинично-анамнестическая характеристика выборки

Показатель	Контроль ($n = 48$)	Сиблинги ($n = 65$)	p
Возраст, Me [Q_1 – Q_3], лет	9,65 [8,36–11,0]	9,56 [8,59–10,9]	0,454
Девочки, n (%)	24 (50,0%)	34 (52,3%)	0,788
Частые ОРВИ (> 5 эпизодов/год), n (%)	10 (20,8%)	27 (41,5%)	0,001
Регулярные занятия спортом, n (%)	27 (56,3%)	23 (35,4%)	0,002
Регулярные занятия музыкой, n (%)	9 (18,8%)	14 (21,5%)	0,738
Регулярные занятия танцами, n (%)	15 (31,3%)	11 (16,9%)	0,016

Примечание: Данные представлены как Me [Q_1 – Q_3] или n (%). Количественные переменные сравнивались критерием Манна–Уитни; категориальные — критерием χ^2 Пирсона или точным критерием Фишера.

Таблица 3. Показатели хронического утомления по субшкалам и результаты линейных смешанных моделей

Субшкала	Группа	Родители, Ме [Q ₁ –Q ₃]	Дети, Ме [Q ₁ –Q ₃]	ρ (группа)	ρ (информант)	ρ (группа × информант)
Общий балл (ИХРУ)	Контроль	12,0 [6,0–16,0]	20,0 [16,0–25,0]	0,002	< 0,001	< 0,001
	Сиблинги	22,0 [15,0–29,0]	20,0 [12,0–28,0]			
Физиологический дискомфорт	Контроль	7,0 [0,0–10,0]%	13,0 [7,0–20,8]%	< 0,001	0,002	0,005
	Сиблинги	23,0 [10,0–30,0]%	20,0 [13,0–30,0]%			
Снижение общего самочувствия	Контроль	14,1 [0,0–26,3]%	30,0 [20,0–40,0]%	0,513	0,009	< 0,001
	Сиблинги	30,0 [15,0–40,0]%	20,0 [10,0–30,0]%			
Нарушения в эмоциональной сфере	Контроль	17,0 [0,0–33,0]%	25,0 [17,0–42,0]%	0,01	0,508	< 0,001
	Сиблинги	49,4 [25,0–66,7]%	25,0 [10,0–58,3]%			
Нарушения в социальной сфере	Контроль	40,0 [10,0–60,0]%	60,0 [50,0–70,0]%	0,58	< 0,001	< 0,001
	Сиблинги	40,0 [30,0–60,0]%	50,0 [30,0–60,0]%			

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха [Q₁–Q₃]; для субшкал — в процентах от максимального балла. LMM с фиксированными эффектами группы, информанта и их взаимодействия; случайный эффект — идентификатор диады. Ковариаты: частота ОРВИ, занятия спортом и танцами.

Согласованность родительских и детских оценок определяли двумя дополнительными методами: вычисляли коэффициент корреляции Спирмена между парными оценками внутри каждой группы, а также для каждой диады рассчитывали разностный показатель Δ = (оценка родителя) — (оценка ребенка); сравнение групп по величине Δ проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Для оценки внутригрупповых различий между оценками родителей и детей использовали критерий Уилкоксона для связанных выборок. Критический уровень статистической значимости во всех анализах принимали равным $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группы контроля и сиблингов не различались по возрасту и полу. В группе сиблингов достоверно чаще регистрировали ОРВИ (более пяти эпизодов в год): 41,5% против 20,8% в группе контроля ($p = 0,001$). Сиблинги реже занимались спортом (35,4% против 56,3%; $p = 0,002$) и танцами (16,9% против 31,3%; $p = 0,016$) (табл. 2). Ни один из показателей утомляемости не оказался связанным с порядком рождения ни в группе сиблингов ($p > 0,4$), ни в группе контроля (критерий Краскела–Уоллиса; $p > 0,2$). Разница в возрасте (доля года) между здоровым и больным сиблингами не оказалась значимо связанной ни с одним параметром утомления (коэффициент корреляции Спирмена; $p > 0,05$). В группе сиблингов при несовпадении пола здорового и больного сиблингов ИХРУ было выше как по детским самооценкам ($U = 270$, $p = 0,003$; $Me_{\text{однополые}} = 13,0$, $Me_{\text{разнополые}} = 25,0$), так и по материнским наблюдениям ($U = 307$, $p = 0,015$; $Me_{\text{однополые}} = 17,0$, $Me_{\text{разнополые}} = 24,0$). Детские самооценки дополнительно выше у разнополых сиблингов по двум субшкалам: «Физический дискомфорт» ($U = 201$, $p = 0,019$; $Me_{\text{однополые}} = 13,0$, $Me_{\text{разнополые}} = 28,5$) и «Нарушения в социальной сфере» ($U = 205$, $p = 0,023$; $Me_{\text{однополые}} = 40,0$, $Me_{\text{разнополые}} = 60,0$). Количество детей в семьях с больным ребенком не было связано ни с одним параметром утомления (везде $p > 0,17$).

Таблица 4. Корреляция между родительскими и детскими оценками уровня хронического утомления (ИХРУ) по группам

Группа	r Спирмена	p
Контроль ($n = 48$)	0,34	0,019
Сиблинги ($n = 65$)	0,73	< 0,001

Примечание: Представлены коэффициенты корреляции Спирмена между оценками родителя и ребенка в рамках одной диады.

Сравнение групп по степени хронического утомления: результаты линейных смешанных моделей

Для оценки межгрупповых различий с учетом структуры данных «диада» применяли LMM. Анализ ИХРУ выявил значимые эффекты группы ($p = 0,002$), информанта ($p < 0,001$), а также их взаимодействия ($p < 0,001$), и это указывает на то, что характер различий между родительскими и детскими оценками значимо различается в двух группах (табл. 3).

В группе контроля родители систематически занижали уровень утомления ребенка по сравнению с самооценкой детей ($Me_{\text{ИХРУ}}: 12,0 [6,0–16,0]$ у родителей против $20,0 [16,0–25,0]$ у детей). В группе сиблингов эта закономерность инвертировалась: родительские оценки были сопоставимы с детскими или превышали их ($22,0 [15,0–29,0]$ у родителей против $20,0 [12,0–28,0]$ у детей).

Анализ субшкал с использованием LMM показал, что взаимодействие «группа × информант» было статистически значимым для всех исследуемых показателей (все $p < 0,01$), что свидетельствует о системном характере выявленных различий (табл. 3).

Эффект группы был наиболее выражен для субшкал «Физиологический дискомфорт» ($p < 0,001$) и «Нарушения в эмоциональной сфере» ($p = 0,010$): по обоим показателям родители сиблингов оценивали состояние детей как более тяжелое, чем родители из группы контроля. Для субшкал «Снижение общего самочувствия» ($p = 0,513$) и «Нарушения в социальной сфере» ($p = 0,580$) эффект группы не достигал уровня значимости, однако значимое взаимодействие сохранялось, что указывает на различный паттерн оценок в группах. Включенные ковариаты в большинстве случаев не оказывали значимого влияния на результаты моделей.

Согласованность оценок родителей и детей

Для детального изучения природы взаимодействия «группа × информант» был проведен ряд дополнительных анализов, включающих оценку корреляции внутри групп,

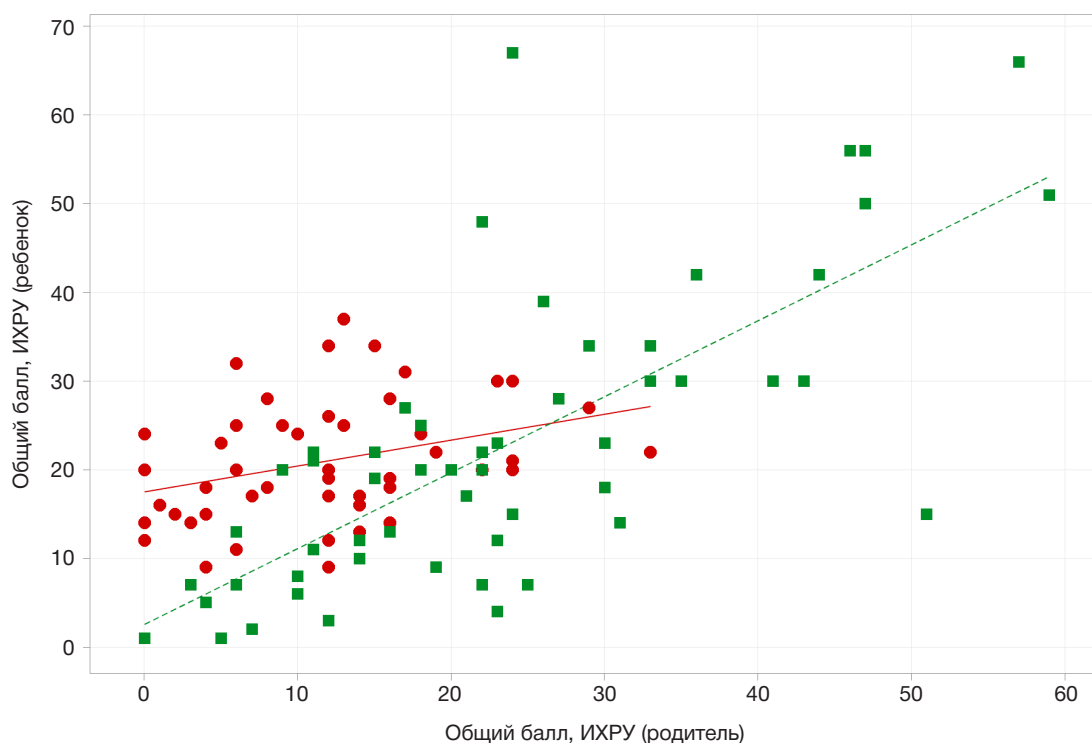


Рис. 1. Точечные диаграммы с линиями линейной регрессии для оценок ИХРУ родителями и детьми в группах контроля (красный) и сиблингов (зеленый). По оси X — оценка родителя; по оси Y — оценка ребенка

анализ разностного показателя Δ и попарное сравнение оценок внутри диад.

Корреляционный анализ (табл. 4, рис. 1) выявил значимое различие в согласованности оценок между группами. В группе контроля связь между родительскими и детскими оценками ИХРУ была слабой ($r = 0,34$, $p = 0,019$). В группе сиблингов наблюдалась сильная положительная корреляция ($r = 0,73$, $p < 0,001$), что свидетельствует о существенно более высокой согласованности восприятия состояния ребенка в диадах сиблингов.

Анализ разностного показателя Δ подтвердил принципиальное различие в характере соотношения оценок. В группе контроля родители недооценивали утомление детей: $Me\Delta = -10,0 [-14,0; -3,0]$ баллов. В группе сиблингов оценки были сопоставимы или незначительно превышали самооценку детей ($Me\Delta = 2,0 [-4,0; 4,0]$). Различия между группами по величине Δ были значимы (критерий Манна-Уитни: $U = 625$, $p < 0,001$, $r = 0,6$).

Внутригрупповые и межгрупповые различия в оценках родителей и детей

Был проведен попарный сравнительный анализ оценок родителей и детей как внутри каждой группы, так и между группами. Результаты представлены на рис. 2.

В группе контроля родительские оценки были достоверно ниже детских по всем субшкалам и суммарному ИХРУ ($p \leq 0,045$), что указывает на устойчивую тенденцию родителей здоровых детей недооценивать уровень утомления ребенка. В группе сиблингов эта закономерность инвертировалась: по субшкалам «Физиологический дискомфорт» и «Нарушения в социальной сфере», а также по суммарному ИХРУ различия между оценками родителей и детей отсутствовали ($p = 0,997$; $p = 0,474$; $p = 0,241$ соответственно). Статистически значимые различия, направленные в сторону завышения родительских оценок, отмечались для субшкал «Снижение

общего самочувствия» ($p = 0,005$) и «Нарушения в эмоциональной сфере» ($p = 0,002$).

При межгрупповом сравнении отдельно по информантам картина также оказалась асимметричной. По данным родителей значимые различия между группами выявлялись по четырем из пяти показателей: «Физиологический дискомфорт», «Снижение общего самочувствия», «Нарушения в эмоциональной сфере» и суммарный ИХРУ (все $p < 0,001$). По детским самооценкам значимые различия наблюдались лишь по отдельным субшкалам: «Физиологический дискомфорт» ($p = 0,037$), «Снижение общего самочувствия» ($p < 0,001$) и «Нарушения в социальной сфере» ($p = 0,016$). По суммарному ИХРУ и субшкале «Нарушения в эмоциональной сфере» самооценки детей двух групп достоверно не различались ($p = 0,729$ и $p = 0,631$ соответственно). Таким образом, основной вклад в межгрупповые различия вносят родительские, а не детские оценки, что согласуется с результатами линейных смешанных моделей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Среди семей, в которых воспитывается ребенок с онкологическим заболеванием, было значимо больше многодетных, что согласуется с крупным социологическим исследованием 1298 российских родителей, имеющих ребенка с онкологическим заболеванием [12]. Было показано, как экзистенциальный стресс, с которым сталкиваются такие семьи, связан с изменением их смысловых ориентаций и системы потребностей, что в совокупности приводит к многодетному образу жизни.

Показатель разнополости в обеих группах оказался связан с выраженностью хронического утомления: он был выше в тех случаях, когда сиблинги были разнополыми. Этот эффект был выявлен при дополнительном анализе, поэтому мы можем лишь выдвинуть ряд гипотез, обсуждаемых в литературе, требующих отдельных исследований. Родители

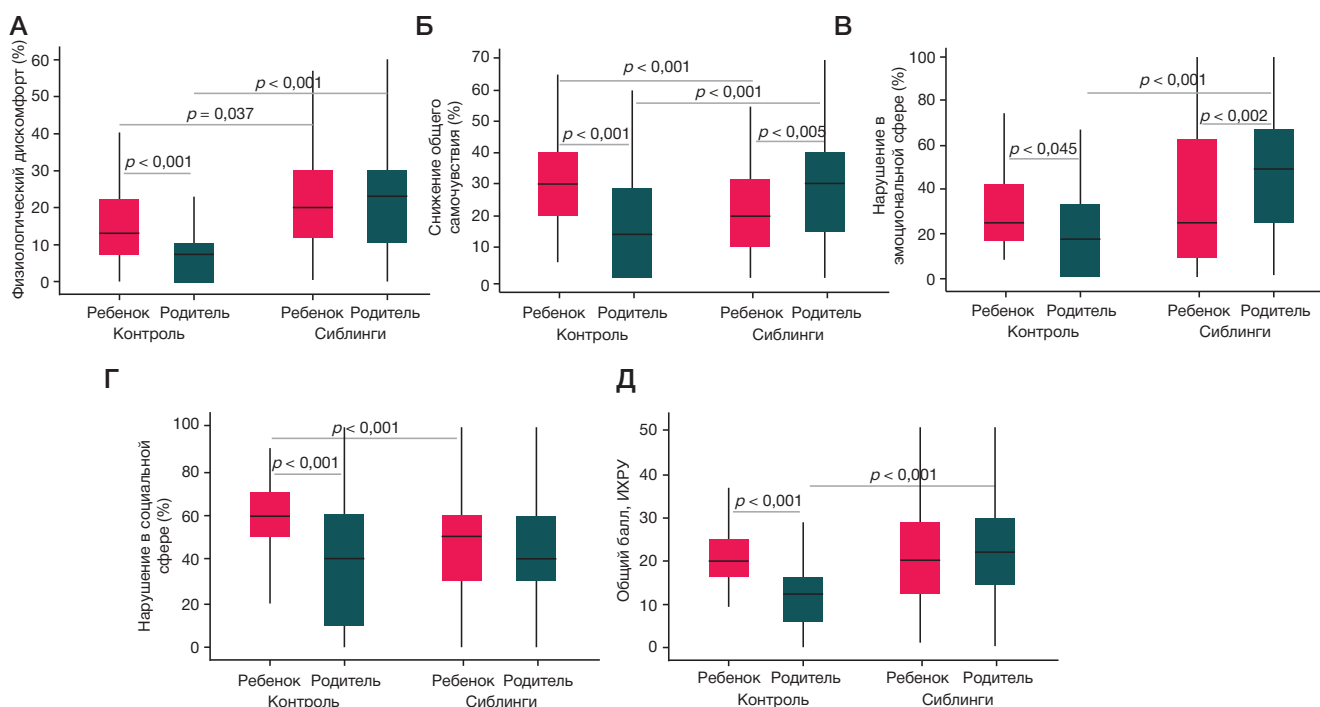


Рис. 2. Боксплоты распределения оценок хронического утомления по субшкалам в группах контроля и сиблингов. Красные боксплоты — оценки детей; зеленые — оценки родителей. Красными скобками с p -значениями обозначены внутригрупповые различия между оценками ребенка и родителя (критерий Уилкоксона для связанных выборок) и межгрупповые различия между группами контроля и сиблингов по каждому информанту (критерий Манна-Уитни). Приведены только статистически значимые сравнения ($p < 0,05$). **А.** Субшкала «Симптомы физиологического дискомфорта». **Б.** Субшкала «Снижение общего самочувствия и когнитивный дискомфорт». **В.** Субшкала «Нарушения в эмоционально-аффективной сфере». **Г.** Субшкала «Снижение мотивации и изменения в сфере социального общения». **Д.** Индекс хронического утомления (ИХРУ, общий балл)

могут по-разному вести себя с разнополыми детьми, предъявляя к ним различные требования и ожидания, по-разному выстраивая с ними эмоциональные отношения, уделяя им время в разных пропорциях [22]. Стоит отметить при этом, что литературные данные противоречивы [23–25]. Согласно крупным семейным исследованиям поведенческих и психологических признаков, одни и те же гены вносят вклад в межличностные различия как у мужчин, так и у женщин, что делает генетические объяснения обнаруженных половых различий менее вероятными в сравнении с социопсихологическими [26].

На этапе выявления межгрупповых различий в образе жизни и состоянии здоровья детей было установлено, что сиблинги из нашей выборки значимо реже занимались спортом и танцами, вдвое чаще болели ОРВИ (табл. 2). Эти данные согласуются с результатами различных исследований, в которых было показано, что братья и сестры педиатрических онкологических пациентов чаще обращаются за медицинской помощью по сравнению со здоровыми сверстниками [5, 14, 27]. Снижение участия в организованных физических занятиях у сиблингов закономерно: перестройка семейного расписания, ухудшение финансовых возможностей семьи, сосредоточенность родителей на нуждах больного ребенка и собственная тревога сиблинга сокращают время и ресурсы для досуговой активности [10, 28]. Учитывая, что регулярная физическая нагрузка является одним из надежно установленных протективных факторов в отношении утомления у детей [29], ее снижение может выступать промежуточным звеном между хроническим семейным стрессом и субъективным ощущением усталости. Вместе с тем в линейных смешанных моделях двигательная активность включалась в число ковариатов, но не объясняла основных эффектов, что указывает на наличие дополнительных механизмов.

По ИХРУ показатели самооценки детей в двух группах значимо не различались, но анализ субшкал раскрывает более дифференцированную картину. По субшкале «Физиологический дискомфорт» показатели сиблингов были значимо выше, чем в группе контроля, тогда как по субшкале «Снижение общего самочувствия» направление различий было обратным: показатели детей группы контроля оказались значимо выше. По субшкале «Нарушения в эмоциональной сфере» самооценки двух групп значимо не различались, а по субшкале «Нарушения в социальной сфере» показатели детей группы контроля также были значимо выше. Таким образом, по детским самооценкам показатели утомления у сиблингов значимо превышают показатели группы контроля лишь по физиологическому компоненту, тогда как в эмоциональной, когнитивно-аффективной и социальной сферах различия либо отсутствуют, либо показатели группы контроля значимо выше. Последнее может отражать акселерационный эффект хронической семейной стрессовой нагрузки: сиблинги онкологических пациентов нередко демонстрируют более высокий уровень просоциального поведения и эмпатии, а также склонность не транслировать собственные трудности, ощущая негласный запрет на демонстрацию слабости в ситуации семейного стресса [10]. К здоровым сиблингам родители чаще обращаются за инструментальной помощью (например, чаще просят о помощи с домашними делами), хотя при этом сами родители реже оказывают аналогичную поддержку своим детям (например, реже разрешают пропускать школьные занятия) [11]. Помимо этого, акселерационные процессы были продемонстрированы на антропометрических показателях сиблингов: значения их роста и индекса массы тела относительно значений сверстников (по данным ВОЗ) были выше, а также у старших по отношению к пациенту сиблингов отмечался более высокий рост [30].

При сопоставлении оценок родителей и детей внутри каждой группы было обнаружено, что в группе контроля родители давали более низкие оценки утомления ребенка, чем сами дети, по всем пяти шкалам. Это согласуется с данными о том, что оценки родителей, основанные на наблюдении, нередко ниже самооценок детей в отношении субъективных, особенно эмоциональных и социальных, аспектов состояния, начиная с 7 лет [31]. В группе сиблингов этот паттерн инвертировался. По субшкалам «Снижение общего самочувствия» и «Нарушения в эмоциональной сфере» родители давали значимо более высокие оценки, чем сами дети. По «Физиологическому дискомфорту», «Нарушениям в социальной сфере» и суммарному ИХРУ различия между оценками родителей и детей в группе сиблингов отсутствовали.

В возрасте 7–11 лет дети активно формируют внутренние картины болезни (ВКБ) и здоровья (ВКЗ). В этот возрастной период субъективное самочувствие уже доступно рефлексии, однако оценка своего состояния как здоровья или болезни все еще сильно зависит от интерпретаций и реакций значимых взрослых [32]. Онтогенез ВКБ/З предполагает движение к большей автономии в самооценках, что мы и наблюдаем в контрольной группе, где детские самоотчеты по ряду субшкал превышают родительские. Такое расхождение может указывать на наличие у ребенка собственных, отличных от родительских, критериев оценки самочувствия, что отражает формирующуюся способность опираться на внутренние ощущения и представления, а не только на транслируемые извне. В условиях хронического семейного стресса, в котором находится семья с ребенком, имеющим жизнеугрожающее заболевание, нормативный онтогенез может модифицироваться. Постоянное присутствие в семье ребенка с объективированными страданиями и транслируемая тревога родителей способны «сдвигать» критерии нормы [33]. Таким образом, отсутствие значимых различий между оценками родителей и детей в группе сиблингов может отражать не столько объективные различия в состоянии детей, сколько особенности онтогенеза ВКБ/З сиблинга, в котором его собственная ВКБ/З остается дольше «слитой» с родительскими оценками и подверженной тревогам семейного окружения.

Анализ линейных смешанных моделей выявил значимое взаимодействие факторов «группа — информант» для всех исследованных показателей. Межгрупповые различия обеспечиваются, прежде всего, родительскими, а не детскими оценками. По данным родителей в группе сиблингов значимо выше показатели утомления по всем субшкалам, кроме социальной. По детским самооценкам картина иная: по «Снижению общего самочувствия» и «Нарушениям в социальной сфере» сиблинги описывали свое состояние как лучшее, чем дети контрольной группы, тогда как по «Физиологическому дискомфорту» как несколько худшее. Такой асимметричный паттерн, при котором межгрупповые различия преимущественно задаются родительскими оценками, согласуется с выдвинутым предположением об опосредованном влиянии родительских оценок на формирование ВКЗ у сиблингов детей с онкологическими заболеваниями.

В 2020 г. было показано, что осведомленность родителей о состоянии сиблинга и точность их оценок определяются, прежде всего, качеством внутрисемейного общения. Хронический стресс, связанный с болезнью другого ребенка, перегруженность уходом и сосредоточенность на нуждах онкологического пациента сокращают

возможности родителей отслеживать состояние здорового ребенка и обсуждать с ним его переживания [34]. В условиях семейного кризиса у родителей нередко развивается повышенная тревожность в отношении здоровья детей в целом — явление, которое описывается в рамках концепции «тревоги за здоровье ребенка по доверенности»: чрезмерные, трудно поддающиеся контролю опасения по поводу возможного неблагополучия ребенка, которые не обязательно соответствуют его актуальному состоянию [33]. Родители детей с онкологическими заболеваниями сами испытывают высокий уровень утомления и эмоционального дистресса [35]. Собственное состояние здоровья и самочувствие опекуна связаны с величиной расхождения между его оценками и оценками ребенка — в частности, по домену утомления это расхождение увеличивалось по мере ухудшения состояния самого опекуна [14]. Совокупность этих факторов — сниженная осведомленность вследствие дефицита общения, фоновая тревога за здорового ребенка, собственный дистресс родителя — создает условия для завышения оценок состояния сиблинга.

Согласованность оценок родителей и детей в группе сиблингов была существенно выше, чем в группе контроля. Близкие результаты получили исследователи, показавшие, что в семьях, затронутых онкологическим заболеванием, согласованность родительского и детского отчетов выше. По-видимому, родители в этих условиях более чувствительны к любым изменениям в состоянии детей [36]. Следует подчеркнуть, что высокая корреляция отражает лишь согласованность направления изменений, но не точность абсолютных оценок. В нашем исследовании высокая корреляция сочеталась с завышением родительских оценок по ряду субшкал, что наглядно демонстрирует необходимость разграничивать эти два аспекта при анализе межинформантного согласия.

Ограничения исследования

Поперечный (одномоментный) характер исследования не позволяет проследить динамику изменений внутри диад.

Собраны и проанализированы исключительно субъективные данные (методы самоотчета и оценки матерей): не исключен фактор социальной желательности.

Ограниченность анализа семейного контекста: неизвестны возраст матерей на момент рождения первого ребенка и на момент исследования, их психический статус, наличие и качество помощи в воспитании; неизвестна степень вовлеченности отцов в воспитание детей; не учтены социально-экономические факторы семьи (место проживания, жилье, доход, образование и трудовая деятельность родителей).

Не проводилась дифференциация группы сиблингов по клиническим характеристикам ребенка с онкологическим заболеванием (дифференциальный диагноз, продолжительность и комплексность лечения, наличие/отсутствие рецидива, длительность динамического наблюдения, коморбидные заболевания и состояния, выраженность жалоб).

Выводы

Настоящее исследование показало, что субъективное хроническое утомление у сиблингов детей с онкологическими заболеваниями не является однородным феноменом и по-разному воспринимается двумя источниками информации (ребенком и его родителем). По данным детских самооценок

межгрупповые различия ограничены физиологической сферой. Наблюдения родителей охватывают большинство исследованных показателей и существенно превышают по величине то, что сообщают сами дети. Ключевой результат состоит в инверсии направления расхождения между родительскими и детскими оценками в зависимости от семейного контекста: если в семьях контрольной группы родители занижают утомление ребенка, то в семьях с онкологически больным ребенком они его систематически завышают. Это расхождение само по себе является информативным показателем и должно учитываться при психосоциальном скрининге сиблингов. Полученные

результаты могут служить обоснованием для включения сиблингов в практику психологического сопровождения семей в детской онкологии и реабилитации. Дальнейшие лонгитюдные исследования с включением показателей родительского стресса и тревоги как предикторов характера межинформантного согласия позволят уточнить механизмы выявленного феномена и разработать более точные ориентиры для поддержки семей в системе детской онкологии. В данной работе не учитывались и требуют дальнейшего изучения такие потенциально значимые факторы, как состав и социально-экономический статус семьи, доступность и характер помощи, тип привязанности.

Литература

- Каприн А. Д., Старинский В. В., Шахзадова А. О., редакторы. Состояние онкологической помощи населению России в 2024 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2025; с. 10.
- Wang M, Bi Y, Fan Y, Fu X, Jin Y. Global incidence of childhood cancer by subtype in 2022: a population-based registry study. *EClinicalMedicine*. 2025; 89: 103571. DOI: 10.1016/j.eclinm.2025.103571.
- Мерабишвили В. М. Состояние онкологической помощи в России: выживаемость детей (0–14 лет). Популяционное исследование на уровне федерального округа. Часть II. Российский журнал детской гематологии и онкологии. 2025; 12 (1): 14–19. DOI: 10.21682/2311-1267-2025-12-1-14-19.
- Тихонова О. А., Крутикова Н. Ю., Карелин А. Ф., Жуковская Е. В., Румянцев А.Г. Влияние злокачественных новообразований на состояние костно-мышечной системы у детей (обзор литературы). *Онкогематология*. 2018; 13 (4): 60–66. DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-4-60-66.
- Feudtner C, Nye RT, Boyden JY, Schwartz CE, Korn E, Wolfe J, et al. Association between children with life-threatening conditions and their parents' and siblings' mental and physical health. *JAMA Netw Open*. 2021; 4 (12): e2137250. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.37250.
- Dussel V, Bona K, Heath JA, Hilden JM, Weeks JC, Wolfe J. Unmeasured costs of a child's death: perceived financial burden, work disruptions, and economic coping strategies used by American and Australian families who lost children to cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29 (8): 1007–13. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.8960.
- Мазурова Н. В. Особенности адаптации родителей к болезни ребенка. *Российский педиатрический журнал*. 2013; 5: 50–56.
- Erker C, Yan K, Zhang L, Bingen K, Flynn KE, Panepinto JA, et al. Impact of pediatric cancer on family relationships. *Cancer Med*. 2018; 7 (5): 1680–8. DOI: 10.1002/cam4.1393.
- Мазурова Н. В., Подольская Т. А. Психолого-педагогическая помощь родителям длительно и тяжело болеющих детей. М.: Перо, 2021; 383 с. ISBN 978-5-00171-525-2.
- Long KA, Lehmann V, Gerhardt CA, Carpenter AL, Marsland AL, Alderfer MA. Psychosocial functioning and risk factors among siblings of children with cancer: an updated systematic review. *Psychooncology*. 2018; 27 (6): 1467–79. DOI: 10.1002/pon.4669.
- Wawrzynski SE, Schaefer MR, Schvaneveldt N, Alderfer MA. Social support and siblings of children with cancer: a scoping review. *Psychooncology*. 2021; 30 (8): 1232–45. DOI: 10.1002/pon.5689.
- Антонов А. И., Гусева М. А. Диспозиционная регуляция репродуктивного и самосохранительного поведения в нетипичных семьях с больным ребенком. Социальные аспекты здоровья населения. 2019; 1 (65): 2. DOI: 10.21045/2071-5021-2019-65-1-2.
- Кокорева М. Е. Роль социальной службы в организации медицинской реабилитации семей, имеющих ребенка с онкологическим заболеванием. *Педиатрический вестник Южного Урала*. 2020; (1): 72–79.
- Sheikh IN, Roth M, Stavinoha PL. Prevalence of sleep disturbances in pediatric cancer patients and their diagnosis and management. *Children*. 2021; 8 (12): 1100. DOI: 10.3390/children8121100.
- Sirveaux V, Puterman-Salzman L, Zhang YQ, Hercun J, Olivier C, Sultan S, et al. Adverse physical health outcomes and healthcare service utilization in siblings of children with cancer: a systematic review. *Cancer Med*. 2025; 14 (15): e71035. DOI: 10.1002/cam4.71035.
- Guidi J, Lucente M, Sonino N, Fava GA. Allostatic load and its impact on health: a systematic review. *Psychother Psychosom*. 2021; 90 (1): 11–27. DOI: 10.1159/000510696.
- Mack JW, McFatrach M, Withycombe JS, Maurer SH, Jacobs SS, Lin L, et al. Agreement between child self-report and caregiver-proxy report for symptoms and functioning of children undergoing cancer treatment. *JAMA Pediatr*. 2020; 174 (11): e202861. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.2861.
- Leahy AB, Steineck A. Patient-reported outcomes in pediatric oncology: the patient voice as a gold standard. *JAMA Pediatr*. 2020; 174 (11): e202868. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.2868.
- Deviaterikova AA, Kasatkin VV, Velichovsky BB. The validity and reliability of the Turkish scale for the assessment of fatigue in pediatric oncology patients aged 7–18 in Russia. *Psychology in Russia: State of the Art*. 2021; 14 (1): 39–48. DOI: 10.11621/pir.2021.0104.
- Леонова А. Б., Кузнецова А. С. Психологические технологии управления состоянием человека. М.: Смысл; 2015. 311 с.
- Nunnally JC, Bernstein IH. *Psychometric Theory*. 3rd ed. McGraw-Hill, 1994.
- Her Y-C, Batur ZZ, Vergauwen J, Mortelmans D. Siblings' similarities and dissimilarities: A review of theoretical perspectives and empirical insights. *Journal of Family Theory & Review*. 2021; 13 (4): 447–62. DOI: 10.1111/jftr.12436.
- Deary IJ, Irwing P, Der G, Bates TB. Brother–sister differences in the g factor in intelligence: Analysis of full, opposite-sex siblings from the NLSY1979. *Intelligence*. 2007; 35 (5): 451–6. DOI: 10.1016/j.intell.2006.09.003.
- Boomsma DI, van Beijsterveldt T Beem AL, Hoekstra RA, Polderman TJC, Bartels M. Intelligence and birth order in boys and girls. *Intelligence*. 2008; 36 (6): 630–4. DOI: 10.1016/j.intell.2008.01.005.
- Алексеева О, Ржанова И. Половые различия по когнитивным и личностным характеристикам у сиблингов в двухдетных семьях. *Психологические исследования*. 2016; 9 (45). DOI: 10.54359/ps.v9i45.487.
- Vink JM, Bartels M, Van Beijsterveldt TC, Van Dongen J, Van Beek JH, Distel MA, Boomsma DI. Sex differences in genetic architecture of complex phenotypes? *PloS one*. 2012; 7 (12): e47371. DOI: 10.1371/journal.pone.0047371.
- Martinez B, Pechlivanoglou P, Meng D, Traubici B, Mahood Q, Korszak D, et al. Clinical health outcomes of siblings of children with chronic conditions: a systematic review and meta-analysis. *J Pediatr*. 2022; 250: 83–92.e8. DOI: 10.1016/j.jpeds.2022.07.002.
- Ohlsen TJD, Buchbinder DK, Dupuis LL, Sung L, Tomlinson D, Hinds PS, et al. Financial toxicity among pediatric oncology families during therapy and early survivorship: a qualitative analysis. *Support Care Cancer*. 2025; 33 (1): 36. DOI: 10.1007/s00520-024-09093-y.
- Braam KI, van der Torre P, Takken T, Veening MA, van Dulmen-den Broeder E, Kaspers GJ. Physical exercise training interventions for

- children and young adults during and after treatment for childhood cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 3 (3): CD008796. DOI: 10.1002/14651858.CD008796.pub3.
30. Лихоманова Е. Н., Горбачева А. К., Ковалева А. В., Чельницкая С. М. Особенности физического развития детей, перенесших лечение по поводу опухоли головного мозга, и здоровых сиблингов онкологических пациентов (пилотное исследование). *Вестник Московского университета. Серия 23. Антропология.* 2024; (2): 62–72. DOI: 10.55959/MSU2074-8132-24-2-5.
 31. Eiser C, Varni JW. Health-related quality of life and symptom reporting: similarities and differences between children and their parents. *Eur J Pediatr.* 2013; 172 (10): 1299–304. DOI: 10.1007/s00431-013-2049-9.
 32. Николаева В. В., Арина Г. А. Тяжело больной ребенок, штрихи к психологическому портрету. *Школа здоровья.* 1994; 2 (2), 86.
 33. Ingeman K, Frostholm L, Frydendal DH, Rask CU, Mikkelsen HT, Høgh M, et al. A new measure of excessive parental worries about children's health: development of the Health Anxiety by Proxy Scale (HAPYS). *Nord J Psychiatry.* 2021; 75 (7): 523–31. DOI: 10.1080/08039488.2021.1900389.
 34. Pariseau EM, Chevalier L, Muriel AC, Long KA. Parental awareness of sibling adjustment: perspectives of parents and siblings of children with cancer. *J Fam Psychol.* 2020; 34 (6): 698–708. DOI: 10.1037/fam0000615.
 35. Kearney JA, Salley CG, Muriel AC. Standards of psychosocial care for parents of children with cancer. *Pediatr Blood Cancer.* 2015; 62 (S5): S632–S683. DOI: 10.1002/pbc.25761.
 36. Paul V, Inhestern L, Winzig J, Escher C, Rutkowski S, Bergelt C, et al. Emotional and behavioral problems of pediatric cancer survivors and their siblings: concordance of child self-report and parent proxy-report. *Psychooncology.* 2023; 32 (8): 1248–56. DOI: 10.1002/pon.6175.
- ## References
1. Kaprin AD, Starinskij VV, Shahzadova AO, redaktory. *Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2024 godu.* M.: MNIOI im. P.A. Gercena — filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2025; s. 10. Russian.
 2. Wang M, Bi Y, Fan Y, Fu X, Jin Y. Global incidence of childhood cancer by subtype in 2022: a population-based registry study. *EClinicalMedicine.* 2025; 89: 103571. DOI: 10.1016/j.eclinm.2025.103571.
 3. Merabishvili VM. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi v Rossii: vyzhivaemost' detej (0–14 let). *Populyacionnoe issledovanie na urovne federal'nogo okruga. Chast' II. Rossijskij zhurnal detskoj gematologii i onkologii.* 2025; 12 (1): 14–19. DOI: 10.21682/2311-1267-2025-12-1-14-19. Russian.
 4. Tihonova OA, Krutikova NYu, Karelin AF, Zhukovskaya EV, Rumyantsev AG. Vliyanie zlokachestvennykh novoobrazovaniy na sostoyanie kostno-myshechnoy sistemy u detej (obzor literatury). *Onkogematologiya.* 2018; 13 (4): 60–66. DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-4-60-66. Russian.
 5. Feudtner C, Nye RT, Boyden JY, Schwartz CE, Korn E, Wolfe J, et al. Association between children with life-threatening conditions and their parents' and siblings' mental and physical health. *JAMA Netw Open.* 2021; 4 (12): e2137250. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2021.37250.
 6. Dussel V, Bona K, Heath JA, Hilden JM, Weeks JC, Wolfe J. Unmeasured costs of a child's death: perceived financial burden, work disruptions, and economic coping strategies used by American and Australian families who lost children to cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29 (8): 1007–13. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.8960.
 7. Mazurova NV. Osobennosti adaptatsii roditel'ej k bolezni rebenka. *Rossijskij pediatricheskij zhurnal.* 2013; 5: 50–56. Russian.
 8. Erker C, Yan K, Zhang L, Bingen K, Flynn KE, Panepinto JA, et al. Impact of pediatric cancer on family relationships. *Cancer Med.* 2018; 7 (5): 1680–8. DOI: 10.1002/cam4.1393.
 9. Mazurova NV, Podolskaya TA. Psihologo-pedagogicheskaya pomoshch' roditelyam dlitel'no i tyazhelo boleyushchih detej. M.: Pero, 2021; 383 s. ISBN 978-5-00171-525-2. Russian.
 10. Long KA, Lehmann V, Gerhardt CA, Carpenter AL, Marsland AL, Alderfer MA. Psychosocial functioning and risk factors among siblings of children with cancer: an updated systematic review. *Psychooncology.* 2018; 27 (6): 1467–79. DOI: 10.1002/pon.4669.
 11. Wawrzynski SE, Schaefer MR, Schvaneveldt N, Alderfer MA. Social support and siblings of children with cancer: a scoping review. *Psychooncology.* 2021; 30 (8): 1232–45. DOI: 10.1002/pon.5689.
 12. Antonov AI, Guseva MA. Dispozitsionnaya regulatsiya reproduktivnogo i samosohranitel'nogo povedeniya v netipichnykh sem'yakh s bol'nym rebenkom. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya.* 2019; 1 (65): 2. DOI: 10.21045/2071-5021-2019-65-1-2. Russian.
 13. Kokoreva ME. Rol' sotsial'noj sluzhby v organizatsii medicinskoj reabilitatsii semej, imeyushchih rebenka s onkologicheskimi zabolevaniyami. *Pediatricheskij vestnik YUzhnogo Urala.* 2020; (1): 72–79. Russian.
 14. Sheikh IN, Roth M, Stavinocha PL. Prevalence of sleep disturbances in pediatric cancer patients and their diagnosis and management. *Children.* 2021; 8 (12): 1100. DOI: 10.3390/children8121100.
 15. Sirveaux V, Puterman-Salzman L, Zhang YQ, Hercun J, Olivier C, Sultan S, et al. Adverse physical health outcomes and healthcare service utilization in siblings of children with cancer: a systematic review. *Cancer Med.* 2025; 14 (15): e71035. DOI: 10.1002/cam4.71035.
 16. Guidi J, Lucente M, Sonino N, Fava GA. Allostatic load and its impact on health: a systematic review. *Psychother Psychosom.* 2021; 90 (1): 11–27. DOI: 10.1159/000510696.
 17. Mack JW, McFatrach M, Withycombe JS, Maurer SH, Jacobs SS, Lin L, et al. Agreement between child self-report and caregiver-proxy report for symptoms and functioning of children undergoing cancer treatment. *JAMA Pediatr.* 2020; 174 (11): e202861. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.2861.
 18. Leahy AB, Steineck A. Patient-reported outcomes in pediatric oncology: the patient voice as a gold standard. *JAMA Pediatr.* 2020; 174 (11): e202868. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2020.2868.
 19. Deviatierikova AA, Kasatkina VV, Velichovsky BB. The validity and reliability of the Turkish scale for the assessment of fatigue in pediatric oncology patients aged 7–18 in Russia. *Psychology in Russia: State of the Art.* 2021; 14 (1): 39–48. DOI: 10.11621/pir.2021.0104.
 20. Leonova AB, Kuznecova AS. Psihologicheskie tekhnologii upravleniya sostoyaniem cheloveka. M.: Smysl; 2015. 311 s. Russian.
 21. Nunnally JC, Bernstein IH. *Psychometric Theory.* 3rd ed. McGraw-Hill, 1994.
 22. Her Y-C, Batur ZZ, Vergauwen J, Mortelmans D. Siblings' similarities and dissimilarities: A review of theoretical perspectives and empirical insights. *Journal of Family Theory & Review.* 2021; 13 (4): 447–62. DOI: 10.1111/jftr.12436.
 23. Deary IJ, Irwing P, Der G, Bates TB. Brother–sister differences in the g factor in intelligence: Analysis of full, opposite-sex siblings from the NLSY1979. *Intelligence.* 2007; 35 (5): 451–6. DOI: 10.1016/j.intell.2006.09.003.
 24. Boomsma DI, van Beijsterveldt T Beem AL, Hoekstra RA, Polderman TJC, Bartels M. Intelligence and birth order in boys and girls. *Intelligence.* 2008; 36 (6): 630–4. DOI: 10.1016/j.intell.2008.01.005.
 25. Alekseeva O, Rzhanova I. Polovye razlichiya po kognitivnym i lichnostnym harakteristikam u siblihov v dvuhdetnykh sem'yakh. *Psihologicheskie issledovaniya.* 2016; 9 (45). DOI: 10.54359/ps.v9i45.487. Russian.
 26. Vink JM, Bartels M, Van Beijsterveldt TC, Van Dongen J, Van Beek JH, Distel MA, Boomsma DI. Sex differences in genetic architecture of complex phenotypes? *PloS one.* 2012; 7 (12): e47371. DOI: 10.1371/journal.pone.0047371.
 27. Martinez B, Pechlivanoglou P, Meng D, Traubici B, Mahood Q, Korszak D, et al. Clinical health outcomes of siblings of children with chronic conditions: a systematic review and meta-analysis. *J Pediatr.* 2022; 250: 83–92.e8. DOI: 10.1016/j.jpeds.2022.07.002.
 28. Ohlsen TJD, Buchbinder DK, Dupuis LL, Sung L, Tomlinson D, Hinds PS, et al. Financial toxicity among pediatric oncology families during therapy and early survivorship: a qualitative analysis. *Support Care Cancer.* 2025; 33 (1): 36. DOI: 10.1007/s00520-024-09093-y.

29. Braam KI, van der Torre P, Takken T, Veening MA, van Dulmen-den Broeder E, Kaspers GJ. Physical exercise training interventions for children and young adults during and after treatment for childhood cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 3 (3): CD008796. DOI: 10.1002/14651858.CD008796.pub3.
30. Lihomanova EN, Gorbacheva AK, Kovaleva AV, Chechelnicaya SM. Osobennosti fizicheskogo razvitiya detej, perenessih lechenie po povodu opuholi golovnogo mozga, i zdorovyh siblingov onkologicheskikh pacientov (pilotnoe issledovanie). *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23. Antropologiya.* 2024; (2): 62–72. DOI: 10.55959/MSU2074-8132-24-2-5. Russian.
31. Eiser C, Varni JW. Health-related quality of life and symptom reporting: similarities and differences between children and their parents. *Eur J Pediatr.* 2013; 172 (10): 1299–304. DOI: 10.1007/s00431-013-2049-9.
32. Nikolaeva VV, Arina GA. Tyazhelo bol'noj rebenok, shtrihi k psihologicheskomu portretu. *Shkola zdorov'ya.* 1994; 2 (2), 86. Russian.
33. Ingeman K, Frostholm L, Frydendal DH, Rask CU, Mikkelsen HT, Høgh M, et al. A new measure of excessive parental worries about children's health: development of the Health Anxiety by Proxy Scale (HAPYS). *Nord J Psychiatry.* 2021; 75 (7): 523–31. DOI: 10.1080/08039488.2021.1900389.
34. Pariseau EM, Chevalier L, Muriel AC, Long KA. Parental awareness of sibling adjustment: perspectives of parents and siblings of children with cancer. *J Fam Psychol.* 2020; 34 (6): 698–708. DOI: 10.1037/fam0000615.
35. Kearney JA, Salley CG, Muriel AC. Standards of psychosocial care for parents of children with cancer. *Pediatr Blood Cancer.* 2015; 62 (S5): S632–S683. DOI: 10.1002/pbc.25761.
36. Paul V, Inhestern L, Winzig J, Escher C, Rutkowski S, Bergelt C, et al. Emotional and behavioral problems of pediatric cancer survivors and their siblings: concordance of child self-report and parent proxy-report. *Psychooncology.* 2023; 32 (8): 1248–56. DOI: 10.1002/pon.6175.

КОМПЛЕКСНЫЙ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *MURRAYA KOENIGII* (L.) SPRENG *IN VITRO*

Ашвак Т. Карим ✉

Фармацевтический колледж, Университет Ти-Кар, Ти-Кар, Ирак

Эволюция вызываемых бактериями с множественной лекарственной устойчивостью заболеваний обуславливает потребность в новых противомикробных препаратах на основе растительного сырья. Листья карри (*Murraya koenigii* L. Spreng.) часто используют в традиционной медицине, однако необходимо подтвердить их фармакологическое действие и эффективность экстракции. Цель исследования: провести качественное фитохимическое профилирование и физико-химическую стандартизацию порошка листьев карри с применением систем с водой, этанолом и метанолом в качестве растворителей. МПК измеряли методом микроразведений, чтобы определить наличие антибактериальной активности в отношении панели клинически значимых патогенов. Для микробиологического анализа использовали диско-диффузионный метод. Для оценки статистических различий после однофакторного дисперсионного анализа использовали апостериорный тест Тьюки. При проведении физико-химического анализа установлены содержание золы общей $15,4\% \pm 0,3\%$ (по массе) и низкое содержание влаги, составившее $4,2\% \pm 0,3\%$ (по массе). Выявлены биологически активные вторичные метаболиты, в том числе танины, алкалоиды и флавоноиды, наличие которых подтверждено при проведении фитохимического скрининга. Применение спиртовых растворителей продемонстрировало большую эффективность экстракции по сравнению с водой. Этанольный экстракт показал высокую антибактериальную активность в отношении *Proteus mirabilis* (21,0 мм) и *Staphylococcus aureus* (21,0 мм) в экспериментах с применением диско-диффузионного метода, а водный экстракт продемонстрировал полное отсутствие активности ($0,0; p < 0,001$). У *Bacillus* sp. и *Streptococcus mutans* были самые низкие значения МПК при применении этанольного экстракта (0,156 мг/мл). Полученные результаты подтверждают возможность разработки *M. koenigii* как природного лекарственного средства путем определения фармакогностических маркеров качества растения и демонстрации факта, что его этанольный экстракт содержит чрезвычайно мощные антибактериальные вещества, особенно эффективные против клинических изолятов грамположительных бактерий.

Ключевые слова: *Murraya koenigii*, антибактериальная активность, фармакогностическая стандартизация, фитохимический скрининг, минимальное ингибирование

✉ **Для корреспонденции:** Ашвак Т. Карим
Университет Ти-Кар, Ти-Кар, Ирак; ashwaq.t.kareem@utq.edu.iq

Статья получена: 18.07.2026 **Статья принята к печати:** 20.08.2026 **Опубликована онлайн:** 31.08.2026

DOI: 10.24075/vrgmu.2026.047

Авторские права: © 2026 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/>).

INTEGRATIVE PHARMACOGNOSTICAL PROFILING & *IN VITRO* ANTIBACTERIAL ACTIVITY ASSESSMENT OF *MURRAYA KOENIGII* (L.) SPRENG

Ashwaq T. Kareem ✉

Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Thi-Qar University, Thi-Qar, Iraq

The evolution of multi drug-resistant bacterial diseases enforces the need for new botanical anti-microbiological drugs. Curry leaf (*Murraya koenigii* L. Spreng) is often used in traditional medicine; however the pharmacognosic effects and extraction efficiency need to be affirmed meticulously. The study aimed at qualitative phytochemical profiling and physicochemical standardization of *M. koenigii* leaf powder by aqueous, ethanolic and methanolic solvent systems, conducted for the first time. MICs were measured by microdilution to determine antibacterial activities against a panel of clinically relevant pathogens; the disc diffusion method was used for microbiological analysis. Tukey's post-hoc test was used after one-way ANOVA to examine statistical differences. Physicochemical examination showed a total ash value of $15.4\% \pm 0.3\%$ w/w and a low moisture content of $4.2\% \pm 0.3\%$ w/w. We detected bioactive secondary metabolites, including as tannins, alkaloids, and, flavonoids were validated by phytochemical screening, with alcoholic solvents showing higher extraction yields than water. The ethanolic extract showed strong antibacterial activity against *Proteus mirabilis* (21.0 mm) and *Staphylococcus aureus* (21.0 mm) in disc diffusion experiments, but the aqueous extract was totally inactive ($0.0, p < 0.001$). *Bacillus* sp. and *Streptococcus mutans* showed the lowest MIC values for the ethanolic extract (0.156 mg/mL). These results validate *M. koenigii*'s potential development as a natural therapeutic agent by establishing pharmacognostic quality markers for the plant and showing that its ethanolic extract contains extremely powerful antibacterial agents, especially effective against Gram-positive clinical isolates.

Keywords: *Murraya koenigii*, antibacterial activity, pharmacognosic standardization, phytochemical screening, minimal inhibition

✉ **Correspondence should be addressed:** Ashwaq T. Kareem
Thi-Qar University, Thi-Qar, Iraq; ashwaq.t.kareem@utq.edu.iq

Received: 18.07.2026 **Accepted:** 20.08.2026 **Published online:** 31.08.2026

DOI: 10.24075/brsmu.2026.047

Copyright: © 2026 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/>).

Микроорганизмы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) распространяются все шире, в связи с чем мировое бремя бактериальных инфекций увеличивается. Растущая лекарственная устойчивость бактерий подчеркивает необходимость совершенствования эпидемиологического надзора и разработки новых

методов лечения, поскольку она представляет собой серьезную проблему для здравоохранения во всем мире [1].

Натуральные продукты, изготовленные из растений, показали свою эффективность в решении этой проблемы. По сравнению с синтетическими препаратами, воздействующими на одну мишень, лекарственные

растения имеют обширный запас разнообразных по своей структуре биологически активных веществ с множеством механизмов действия, способных снизить риск развития лекарственной устойчивости. Лекарственные средства на основе растительных компонентов особенно популярны в развивающихся странах, где почти 80% населения получают первичную медицинскую помощь в виде традиционных натуральных растительных препаратов [2].

Murraya koenigii (L.) Spreng. — произрастающее в тропиках и субтропиках дерево из семейства Rutaceae, которое является аборигенным видом для Азии, прежде всего для Индии и Шри-Ланки [3]. Обычно называемое деревом карри или «карри-патта», это вечнозеленое дерево выращивают ради его ароматных листьев, которые представляют собой важнейший ингредиент южно-азиатской кухни. Помимо использования в кулинарии *M. koenigii* широко известна как традиционное средство для лечения многих заболеваний, применяемое в таких системах, как Аюрведа и Унани [4]. Листья традиционно принимали внутрь в качестве тонизирующего, желудочного, ветрогонного, противоглистного средства, при кожных высыпаниях и рвоте [5].

Потенциальные фармакологические свойства *M. koenigii* обусловлены его богатым фитохимическим профилем. Среди многочисленных вырабатываемых этим растением вторичных метаболитов можно выделить карбазоловые алкалоиды, терпеноиды, флавоноиды, эфирные масла и полифенолы [6]. Кенигин, маханамбин и мурраянин относятся к классу алкалоидов с карбазольным скелетом. Именно это в их составе обуславливает разнообразную биологическую активность, в том числе антиоксидантные, антибактериальные и противораковые свойства [7].

Недавние научные исследования подтвердили многие традиционные представления. Исследования продемонстрировали выраженные противовоспалительные, антибактериальные, антиоксидантные, противодиабетические и цитотоксические свойства *M. koenigii*, подтвердили многие «бабушкины сказки». Было установлено, что *M. koenigii* обладает выраженными противовоспалительными, антибактериальными, антиоксидантными, противодиабетическими и цитотоксическими свойствами [8]. Кроме того, растение оказалось перспективным с точки зрения лечения биопленочных инфекций [9]. Биопленки представляют собой ключевой фактор развития значимых хронических заболеваний, вызываемых устойчивыми к антибиотикам бактериями. Для обеспечения гарантии подлинности, качества и степени очистки лекарственных средств на основе растительного сырья необходима фармакогностическая стандартизация [10].

Согласно заявлению ВОЗ, определение фармакогностических параметров, таких как макроскопические и микроскопические признаки, физико-химические константы и фитохимические профили, важно для оценки качества лекарственных растений [11]. Листья *M. koenigii* по-прежнему остаются недостаточно изученными. Предметом более ранних фармакогностических исследований были побеги и корни [12, 13].

То же самое относится и к содержанию эфирных масел в *M. koenigii*, которое стало предметом многочисленных исследований, продемонстрировавших значительные различия в зависимости от географического происхождения растения. β -Кариофиллен (от 16,6 до 26,6%) и α -гумулен (от 15,2 до 26,7%) — это два основных летучих метаболита, обнаруженных в образцах из Малайзии

[13]. Анализ газовой фазы показал, что β -кариофиллен составлял 27,4%, а α -пинен — 37,5%. Это соединения, которые чаще всего обнаруживали в ходе предыдущих исследований [14]. Линалоол (32,83%), элеол (7,44%), геранилацетат (6,18%) и мирцен (6,12%) были основными компонентами эфирного масла из южной Индии [15]. Нашей целью было всесторонне проанализировать листья *Murraya koenigii*, применив комплексный подход к оценке антибактериальной активности: определить МПК и эффективность в отношении клинически значимых бактериальных патогенов *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Определение и сбор растительного сырья

Листья *Murraya koenigii* были собраны в ботаническом саду Сулемании (г. Сулеймания, Ирак) в апреле 2025 г. и высушены в тени. Растительный материал идентифицировал и определял специалист по систематике растений согласно описанному ранее методу [16]. Высушенные листья измельчали до частиц размером 250–500 мкм. Экстракцию выполняли, используя 70%-й этиловый спирт (соотношение сырья и растворителя 1 : 10 (масса/объем)), методом мацерации в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем экстракты фильтровали и концентрировали посредством выпаривания [14].

Фармакогностический анализ

Физико-химические параметры

Физико-химическому анализу подвергали измельченные в порошок листья — в соответствии с рекомендациями ВОЗ по контролю качества лекарственных средств на основе растительного сырья. Выполняли следующее: визуальный осмотр на наличие примесей органического происхождения и отделение ненужного; определение содержания влаги (потери при сушке) посредством высушивания при 105 °C до постоянной массы [11].

Содержание нерастворимой в кислоте, водорастворимой и общей золы измеряли посредством сжигания при 450 °C в муфельной печи [10].

Скрининг на наличие фитохимических соединений

Для обнаружения сапонинов, дубильных веществ, стероидов, терпеноидов, флавоноидов, сердечных гликозидов, алкалоидов, смол, аминокислот и других вторичных метаболитов водный экстракт и экстракты, полученные с помощью других растворителей, подвергали качественному фитохимическому скринингу с применением стандартных методов [17].

Оценка антибактериального действия

Штаммы бактерий

Панель грамположительных и грамотрицательных бактерий, предоставленную кафедрой микробиологии университета Ти-Кар, использовали для оценки антибактериального действия в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis* и *Enterobacter aerogenes*.

Таблица 1. Физико-химические параметры листьев *M. koenigii*

Параметр	Значение (% по массе)
Содержание примесей органического происхождения	< 1%
Содержание влаги	4,2 ± 0,3
Содержание золы общей	15,4 ± 0,3
Содержание золы, нерастворимой в кислоте	4,7 ± 0,2

Диско-диффузионный метод

Сначала метод диффузии [18] в агар использовали для скрининга экстрактов на наличие антибактериального действия. В чашках Петри, заполненных средой Мюллера–Хинтона с равномерно нанесенной на нее взвесью бактерий, выращивали ночные культуры бактерий, которые приводили в соответствие со стандартом мутности Макфарланда 0,5. На покрытую бактериями поверхность агара наносили диски с разным количеством анализируемых образцов. В качестве положительного контроля использовали стандартные диски с антибиотиком. Диаметр зоны подавления роста в миллиметрах определяли после инкубирования чашек Петри в течение 24 ч при 37 °C [19, 20]. Для вычислений использовали средние арифметические для трех повторений.

Определение МПК

Для расчета МПК экстрактов использовали метод серийного микроразведения (двукратного) в бульоне. Анализируемые образцы последовательно разводили в два раза в лунках 96-луночного планшета. В каждую лунку добавляли бактериальную суспензию (около 1×10^2 КОЕ/мл). Планшеты инкубировали в течение целых суток при 37 °C. Минимальную концентрацию, при которой отсутствовал видимый рост бактерий, определяли как минимальную подавляющую концентрацию (МПК) [21].

Статистический анализ

Каждый эксперимент проводили в трех повторениях, результаты представляли как среднее арифметическое ± стандартное отклонение (SD). Для статистической обработки использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный тест Тьюки для множественных сравнений. Статистическую значимость определяли как $p < 0,05$. В каждой таблице представлены примененные статистические критерии [2, 19].

Таблица 2. Фитохимические соединения, обнаруженные в экстрактах листьев *M. koenigii*

Классы фитохимических соединений	Водный экстракт	Метанольный экстракт	Этанольный экстракт
Танины	+	+	+
Сапонины	+	+	+
Стероиды	+	+	+
Терпеноиды	+	+	+
Сердечные гликозиды	+	+	+
Флавоноиды	+	+	+
Алкалоиды	+	+	+
Смолы	–	+	+
Аминокислоты	+	+	+

Примечание: + — обнаружены, – — не обнаружены

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физико-химические параметры

В табл. 1 представлены установленные физико-химические свойства измельченных в порошок листьев. Лекарственный препарат не содержал каких-либо иных частей растения, плесени, насекомых или других примесей животного происхождения, поскольку содержание примесей органического происхождения было менее 1% (по массе). Влажность образцов высушенных листьев составляла примерно 4,2% (по массе). Влажность препарата способствует росту часто встречающихся бактерий и плесени, а неправильная сушка приводит к ферментативному расщеплению активных ингредиентов. Таким образом, низкое содержание влаги в образцах свидетельствует о том, что листья были правильно высушены, чтобы их было проще хранить.

Установленное содержание золы общей было около 15,4% (по массе). Низкое содержание золы позволяет предположить низкое содержание неорганических веществ в растительном препарате. Исходное лекарственное сырье было в меньшей степени загрязнено неорганическими примесями, такими как песок или почва, о чем свидетельствует содержание нерастворимой в кислоте золы, составляющее примерно 4,7% (по массе).

Скрининг на наличие фитохимических соединений

При проведении качественного скрининга на наличие фитохимических соединений в водном экстракте и экстрактах, полученных с помощью других растворителей, обнаружены биологически активные вещества нескольких типов (табл. 2). Для качественного анализа использовали стандартные методы фитохимического анализа. В результатах представлены средние арифметические трех отдельных экспериментов.

Согласно результатам фитохимического анализа, в водном экстракте листьев обнаружены танины, сапонины,

Таблица 3. Зоны подавления роста тестовых бактерий для этанольного и водного экстрактов листьев *Murraya koenigii*

Тестовый организм	Этанольный экстракт (мм)	Водный экстракт (мм)	Положительный контроль гентамицин 10 мкг (мм)	F	p
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	0	20	881,25	< 0,001
<i>Escherichia coli</i>	14	0	16	456	< 0,001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	0	19	625,33	< 0,001
<i>Salmonella typhi</i>	16	0	18	522	< 0,001
<i>Bacillus subtilis</i>	20	0	20	600	< 0,001
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	0	17	433,5	< 0,001
<i>Proteus mirabilis</i>	21	0	23	738	< 0,001
<i>Enterobacter aerogenes</i>	14	0	20	526	< 0,001

стероиды, терпеноиды и сердечные гликозиды. Более полный профиль, в котором дополнительно присутствуют смолы, получен для метанольного экстракта листьев.

Антибактериальная активность

Результаты исследования с применением диско-диффузионного метода

В табл. 3 и на рисунке представлена антибактериальная активность этанольного и водного экстрактов листьев *Murraya koenigii* в отношении клинически значимых бактериальных инфекций. Зоны подавления роста представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Для водного экстракта установлено отсутствие активности (0,0 мм) в отношении какого-либо тестового организма, этанольный экстракт продемонстрировал выраженный антибактериальный эффект в отношении всех тестовых организмов — диаметр зоны подавления роста варьировал между 13 мм для *Klebsiella pneumoniae* и 21 мм для *Staphylococcus aureus* и *Proteus mirabilis*. Разброс значений критерия Фишера (F) был от 881,25 (*S. aureus*) до 433,50 (*K. pneumoniae*), что показало наличие значимых различий между исследованными группами для всех использованных штаммов бактерий.

Выявлена сравнимая с положительным контролем активность в отношении *B. subtilis* (20 мм/20 мм) и *S. aureus* (21 мм/20 мм). При этом обнаружено значительно более слабое действие против грамотрицательных организмов, таких как *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* и *E. aerogenes* ($p < 0,05$).

Значения МПК экстрактов для различных тестовых патогенов представлены в табл. 4. Для *Bacillus sp.* и *S. mutans* показана самая высокая активность этанольного экстракта — МПК для обоих штаммов составила 0,156 мг/мл. Более высокие значения МПК (0,625 мг/мл) установлены для *S. typhi*, *E. coli* и *S. aureus*, при этом водный экстракт оказался совершенно неэффективным.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследованные нами физико-химические факторы представляют собой надежные маркеры для выявления фальсификации смесей для изготовления лекарственных препаратов и подтверждения стабильности качества от партии к партии. Согласно полученным результатам, содержание примесей органического происхождения составило < 1% (по массе), т. е. препарат не содержит загрязнений в виде плесени, насекомых, других компонентов животного происхождения или других



Рис. Различные зоны подавления роста для водного и этанольного экстрактов, а также положительного контроля

Таблица 4. Значения МПК экстрактов *M. koenigii* для тестовых патогенов

Тестовый организм	Этанольный экстракт	Водный экстракт
<i>S. mutans</i>	0,156	–
<i>S. aureus</i>	0,625	–
<i>E. coli</i>	0,625	–
<i>Salmonella typhi</i>	0,625	–
<i>Salmonella</i> sp.	0,312	–
<i>Bacillus</i> sp.	0,156	–

частей растения [11]. Это важнейший критерий качества, поскольку использование посторонних ингредиентов может отрицательно повлиять на эффективность и безопасность растительного препарата.

Установленное нами содержание влаги в 4% (по массе) имеет решающее значение для стабильности растительного лекарственного средства. Высокое содержание влаги может способствовать появлению плесени и бактерий, а также разрушению активных веществ. Низкое содержание влаги в наших образцах показывает, что они были высушены должным образом, чтобы сделать возможным хранение и сохранить биологически активные компоненты [11].

Содержание золы общей (15,4% по массе) говорит о содержании минеральных веществ в препарате. Адекватное содержание золы свидетельствует о невысоком содержании неорганических веществ в продукте, что является хорошим признаком. Содержание золы, нерастворимой в кислоте (4,8% по массе), говорит о незначительном загрязнении сырья песком или почвой [10].

Эти фармакогностические переменные согласуются с результатами проведенных в разных регионах исследований. В ходе исследования, проведенного в Гуджарате, установлено, что содержание влаги составило $1,12\% \pm 0,03\%$ (по массе) и $1,31\% \pm 0,12\%$ (по массе), содержание золы, нерастворимой в кислоте, — $0,59\% \pm 0,01\%$ (по массе) и $0,20\% \pm 0,02\%$ (по массе), а содержание золы общей — $15,66\% \pm 0,32\%$ (по массе) (Ананд) и $12,29\% \pm 0,08\%$ (по массе) [12]. Небольшие различия, которые могут быть обусловлены географическими факторами, составом почвы и методами ведения сельского хозяйства, подчеркивают необходимость региональных фармакогностических критериев.

В более ранних исследованиях скрининг на наличие фитохимических соединений использовали для идентификации различных биологически активных веществ [17]. Эти вещества, известные своими противомикробными свойствами, вносят свой вклад в общую антибактериальную активность растения.

Танины обладают выраженным бактерицидным эффектом. Из-за способности связываться с белками и останавливать процесс формирования клеточной стенки бактерий танины представляют собой полифенольные соединения, обладающие бактериостатическими и бактерицидными свойствами. Согласно результатам многочисленных исследований, они могут препятствовать образованию биопленок, образуя комплексы с бактериальными адгезинами [22]. Благодаря амфифильным свойствам сапонины могут вызывать лизис клеток и нарушать целостность клеточных мембран бактерий [23]. Стероиды и терпеноиды хорошо известны благодаря активности в отношении клеточных мембран и способности ингибировать бактериальные ферменты [24].

Результаты нашего и других исследований показали, что благодаря антибактериальной активности экстракты

M. koenigii демонстрируют значимую эффективность против ряда терапевтически значимых патогенов, среди которых как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии [2, 25, 26]. Качественный фитохимический скрининг экстрактов листьев *Murraya koenigii* показал, что смолы присутствовали только в экстрактах, полученных с помощью органических растворителей, а сапонины, танины, терпеноиды, стероиды, флавоноиды, сердечные гликозиды, аминокислоты и алкалоиды — во всех трех экстрактах (водном, метанольном и этанольном). Данный набор различных групп фитохимических соединений согласуется с данными более ранних исследований *M. koenigii*, в ходе которых были идентифицированы терпеноиды, танины, флавоноиды и карбазольные алкалоиды как уникальные компоненты этого лекарственного растения [27].

Полное отсутствие смол в водном экстракте и их присутствие как в метанольном, так и в этанольном экстракте демонстрируют более высокую эффективность экстракции неполярных биологически активных соединений при применении органических растворителей, подтвердив мнение, что метанол и этанол являются лучшими растворителями для экстракции широкого спектра вторичных метаболитов, чем вода [28]. Как и в более ранних исследованиях, в ходе этой работы были проанализированы фитохимический профиль и антибактериальная активность экстрактов листьев *Murraya koenigii* (карри). Фитохимический анализ выявил в этанольном экстракте следующие биологически активные компоненты: флавоноиды, алкалоиды, фенолы, стероиды, терпеноиды, гликозиды, танины и сапонины. Обнаружено высокое содержание алкалоидов по сравнению с другими лекарственными растениями [27], что согласуется с полученным нами профилем.

Диско-диффузионный метод и определение МПК использовали для оценки антибактериальной активности и эффективности против восьми видов бактерий. Этанольный экстракт продемонстрировал разную антибактериальную активность — диаметр зоны подавления роста варьировал от 21,0 до 13,0 мм. Примечательно, что ни на одну из тестовых бактерий не подействовал водный экстракт. Это может быть связано со слабой способностью воды поглощать неполярные биологически активные вещества, обладающие антибактериальным потенциалом, такие как терпеноиды, карбазоловые алкалоиды и флавоноиды.

Эффективность этанольного экстракта против инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, установлена на основании факта, что его эффективность против *Bacillus subtilis* и *S. aureus* эквивалентна результатам, полученным для положительного контроля. Результаты, полученные ранее [27], согласуются с результатами нашего исследования. Толстый слой пептидогликана в клеточных стенках грамположительных бактерий, который способствует проникновению веществ,

в отличие от дополнительного барьера проницаемости в виде внешней мембраны у грамотрицательных бактерий, объясняет обнаруженную разницу в чувствительности. Грамположительные бактерии более восприимчивы.

Экстракт растения показал эффективность в отношении бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (диаметр зоны подавления роста 17,0 мм), представляющую собой частую причину внутрибольничных инфекций вследствие устойчивости к антибиотикам и образования биопленок. Это одна из клинически сложных бактерий, в отношении которой использованный экстракт продемонстрировал выраженный эффект. В одном из подробных обзоров 2024 г. упомянуто наличие умеренной активности в отношении *S. typhi* и *E. coli* [29]. Помимо этого, активность в отношении *P. mirabilis* и *Enterobacter aerogenes* указывает, что экстракт потенциально может иметь широкий спектр действия, и это подтверждает предыдущие выводы о том, что экстракты, полученные с помощью органических растворителей, превосходят водные экстракты [29].

Выявлено выраженное действие против *Bacillus* sp. и *Streptococcus mutans* (МПК = 0,156 мг/мл), при этом действие против *S. mutans* особенно примечательно ввиду вклада этой бактерии в развитие кариеса. Более высокие значения МПК установлены для таких грамотрицательных и грамположительных бактерий, как *E. coli*, *S. typhi* и *S. aureus*

(0,625 мг/мл), что согласуется с результатами предыдущих исследований. Целесообразность традиционного использования листьев карри при желудочно-кишечных проблемах подтверждается МПК, установленной для *Salmonella* sp. (0,312 мг/мл).

ВЫВОДЫ

Антибактериальное действие обусловлено сочетанием многочисленных фитохимических веществ, таких как терпеноиды, алкалоиды, танины и флавоноиды, которые нарушают целостность клеточных мембран бактерий и работу ферментов. Исследование подтвердило целесообразность традиционного использования *M. koenigii*, эффективно установив фармакогностические стандарты для растения и показав, что его этанольный экстракт демонстрирует выраженный антибактериальный эффект, эквивалентный эффекту других антибиотиков, и действует на широкий спектр бактерий. Несмотря на необходимость дальнейших исследований *in vivo* и клинических исследований, полученные результаты подтверждают целесообразность разработки натуральных антибактериальных препаратов на основе *M. koenigii* и подчеркивают преимущества использования этанола в качестве растворителя для экстракции.

Литература

1. El-Shiekh RA, et al. Anticholinesterases activity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. and *Murraya paniculata* (L.) Jacq. essential oils with GC/MS analysis and molecular docking. *Natural Product Research*. 2024; 38 (12): 2155–9.
2. Anika A, Kaur S. Phytochemical screening of hydroethanolic *Murraya koenigii* Spreng leaves extract by spectroscopic methods. *Journal of Drug Research in Ayurvedic Sciences*. 2024; 9 (4): 273–85.
3. Maheswari KU, Sankar S. In silico molecular docking of phytochemicals of *Murraya koenigii* against *Streptococcus mutans*. *Cureus*. 2024; 16 (2).
4. Savitha G, Balamurugan S. Pharmacognostical and antibacterial evaluation of *Murraya koenigii* (L) Spreng. *International Letters of Natural Sciences*. 2014; 17.
5. Nagappan T, Ramasamy P, Vairappan CS. Chemotaxonomical markers in essential oil of *Murraya koenigii*. *Natural Product Communications*. 2012; 7 (10): 1934578X1200701034.
6. Verma RS, et al. Phytochemical diversity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. from western Himalaya. *Chemistry & Biodiversity*. 2013; 10 (4): 628–41.
7. Patil N, et al. Pharmacognostical, Preliminary phytochemical screening and Antibacterial activity of methanol Extract of *Murraya koenigii*. *PharmaTutor*. 2019; 7 (2): 18–20.
8. Rajendran MP, Pallaiyan BB, Selvaraj N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2014; 4 (3): 200.
9. Chibueze IJ, Emenike I. *Murraya koenigii* — a boon in different pathological conditions. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. 2016.
10. Organization WH. Quality control methods for herbal materials. 2011: World Health Organization.
11. Sindhu RK, Arora S. Phytochemical and Pharmacognostical Studies on *Murraya koenigii* (L) spreng. *Roots. Drug Invention Today*. 2015; 7 (1).
12. Adebajo AC, et al. Evaluation of the Ethnomedical Claims of *Murraya koenigii*. *Pharmaceutical Biology*. 2005; 42 (8): 610–20.
13. Kumar KT, Sundar PD. Evaluation of antibacterial, antifungal and anthelmintic activity of *Murraya Koenigii* spreng. 2011.
14. Kaur S, et al. Chemopreventive activity of hydroethanolic *Murraya koenigii* leaves extract (HEMKLE) against chemically induced skin carcinogenesis in mice. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2020.
15. Handral HK, Pandith A, Shruthi S. A review on *Murraya koenigii*: multipotential medicinal plant. *Asian J Pharm Clin Res*. 2012; 5 (4): 5–14.
16. Handral HK, Jha PK. Pharmacognostic and phytochemical studies on the leaves of *Murraya koenigii* (L) Spreng. *Pharmacophore*. 2010; 1 (3): 231–8.
17. Meena S, et al. Transcriptomic insight into terpenoid and carbazole alkaloid biosynthesis, and functional characterization of two terpene synthases in curry tree (*Murraya koenigii*). *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 44126.
18. Kashyap S, Rathod Y, Biswas S. *Murraya koenigii* methanolic extract inhibits bacterial growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Scientific Reports*. 2025; 15 (1): 34056.
19. Samanta SK, et al. Phytochemical portfolio and anticancer activity of *Murraya koenigii* and its primary active component, mahanine. *Pharmacological research*. 2018; 129: 227–36.
20. Saadoon SJ, et al. Surgical site infection: The Physiological Changes & the Effect of Using Preoperative Antibiotic Prophylaxis in Orthopedic Surgeries. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University*. 2026.
21. Patil R, Mandlik S, Mandlik D. *Murraya koenigii* (Curry Tree): A review of its phytochemistry, ethnomedicinal uses, and pharmacology with respect to molecular mechanisms. *Current Traditional Medicine*. 2024; 10 (5): 73–97.
22. Nandan S, et al. Quantitative analysis of bioactive carbazole alkaloids in *Murraya koenigii* (L.) from six different climatic zones of India using UPLC/MS/MS and their principal component analysis. *Chemistry & Biodiversity*. 2021; 18 (12): e2100557.
23. Mondal P, et al. Extract of *Murraya koenigii* selectively causes genomic instability by altering redox-status via targeting PI3K/AKT/Nrf2/caspase-3 signaling pathway in human non-small cell lung cancer. *Phytomedicine*. 2022; 104: 154272.
24. Nadaf S, et al. Antiproliferative and caspase-mediated apoptosis inducing effects of *Murraya koenigii* seeds against cancer cells.

- South African Journal of Botany. 2020; 132: 328–37.
25. Choudhury RP, Garg A. Variation in essential, trace and toxic elemental contents in *Murraya koenigii*—A spice and medicinal herb from different Indian states. *Food Chemistry*. 2007; 104 (4): 1454–63.
 26. Gahlawat DK, Jakhar S, Dahiya P. *Murraya koenigii* (L.) Spreng: an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014; 3 (3): 109–19.
 27. Abdullah R, et al. Phytochemical and antimicrobial properties of different plants and in silico investigation of their bioactive compounds in wound healing and rheumatism. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2024; 31 (3): 103942.
 28. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999; 12 (4): 564–82.
 29. Franyoto, YD, A. Nurrochmad, and N. Fakhrudin, *Murraya koenigii* L. Spreng.: An updated review of chemical composition, pharmacological effects, and toxicity studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2024; 14 (6): 011–027.
- ## References
1. El-Shiekh RA, et al. Anticholinesterases activity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. and *Murraya paniculata* (L.) Jacq. essential oils with GC/MS analysis and molecular docking. *Natural Product Research*. 2024; 38 (12): 2155–9.
 2. Anika A, Kaur S. Phytochemical screening of hydroethanolic *Murraya koenigii* Spreng leaves extract by spectroscopic methods. *Journal of Drug Research in Ayurvedic Sciences*. 2024; 9 (4): 273–85.
 3. Maheswari KU, Sankar S. In silico molecular docking of phytochemicals of *Murraya koenigii* against *Streptococcus mutans*. *Cureus*. 2024; 16 (2).
 4. Savitha G, Balamurugan S. Pharmacognostical and antibacterial evaluation of *Murraya koenigii* (L) Spreng. *International Letters of Natural Sciences*. 2014; 17.
 5. Nagappan T, Ramasamy P, Vairappan CS. Chemotaxonomical markers in essential oil of *Murraya koenigii*. *Natural Product Communications*. 2012; 7 (10): 1934578X1200701034.
 6. Verma RS, et al. Phytochemical diversity of *Murraya koenigii* (L.) Spreng. from western Himalaya. *Chemistry & Biodiversity*. 2013; 10 (4): 628–41.
 7. Patil N, et al. Pharmacognostical, Preliminary phytochemical screening and Antibacterial activity of methanol Extract of *Murraya koenigii*. *PharmaTutor*. 2019; 7 (2): 18–20.
 8. Rajendran MP, Pallaiyan BB, Selvaraj N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant profile of essential oil from *Murraya koenigii* (L.) leaves. *Avicenna journal of phytomedicine*. 2014; 4 (3): 200.
 9. Chibueze IJ, Emenike I. *Murraya koenigii* — a boon in different pathological conditions. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*. 2016.
 10. Organization WH. Quality control methods for herbal materials. 2011: World Health Organization.
 11. Sindhu RK, Arora S. Phytochemical and Pharmacognostical Studies on *Murraya koenigii* (L) spreng. *Roots. Drug Invention Today*. 2015; 7 (1).
 12. Adebajo AC, et al. Evaluation of the Ethnomedical Claims of *Murraya koenigii*. *Pharmaceutical Biology*. 2005; 42 (8): 610–20.
 13. Kumar KT, Sundar PD. Evaluation of antibacterial, antifungal and anthelmintic activity of *Murraya Koenigii* spreng. 2011.
 14. Kaur S, et al. Chemopreventive activity of hydroethanolic *Murraya koenigii* leaves extract (HEMKLE) against chemically induced skin carcinogenesis in mice. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2020.
 15. Handral HK, Pandith A, Shruthi S. A review on *Murraya koenigii*: multipotential medicinal plant. *Asian J Pharm Clin Res*. 2012; 5 (4): 5–14.
 16. Handral HK, Jha PK. Pharmacognostic and phytochemical studies on the leaves of *Murraya koenigii* (L) Spreng. *Pharmacophore*. 2010; 1 (3): 231–8.
 17. Meena S, et al. Transcriptomic insight into terpenoid and carbazole alkaloid biosynthesis, and functional characterization of two terpene synthases in curry tree (*Murraya koenigii*). *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 44126.
 18. Kashyap S, Rathod Y, Biswas S. *Murraya koenigii* methanolic extract inhibits bacterial growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Scientific Reports*. 2025; 15 (1): 34056.
 19. Samanta SK, et al. Phytochemical portfolio and anticancer activity of *Murraya koenigii* and its primary active component, mahanine. *Pharmacological research*. 2018; 129: 227–36.
 20. Saadoon SJ, et al. Surgical site infection: The Physiological Changes & the Effect of Using Preoperative Antibiotic Prophylaxis in Orthopedic Surgeries. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University*. 2026.
 21. Patil R, Mandlik S, Mandlik D. *Murraya koenigii* (Curry Tree): A review of its phytochemistry, ethnomedicinal uses, and pharmacology with respect to molecular mechanisms. *Current Traditional Medicine*. 2024; 10 (5): 73–97.
 22. Nandan S, et al. Quantitative analysis of bioactive carbazole alkaloids in *Murraya koenigii* (L.) from six different climatic zones of India using UPLC/MS/MS and their principal component analysis. *Chemistry & Biodiversity*. 2021; 18 (12): e2100557.
 23. Mondal P, et al. Extract of *Murraya koenigii* selectively causes genomic instability by altering redox-status via targeting PI3K/AKT/Nrf2/caspase-3 signaling pathway in human non-small cell lung cancer. *Phytomedicine*. 2022; 104: 154272.
 24. Nadaf S, et al. Antiproliferative and caspase-mediated apoptosis inducing effects of *Murraya koenigii* seeds against cancer cells. *South African Journal of Botany*. 2020; 132: 328–37.
 25. Choudhury RP, Garg A. Variation in essential, trace and toxic elemental contents in *Murraya koenigii*—A spice and medicinal herb from different Indian states. *Food Chemistry*. 2007; 104 (4): 1454–63.
 26. Gahlawat DK, Jakhar S, Dahiya P. *Murraya koenigii* (L.) Spreng: an ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014; 3 (3): 109–19.
 27. Abdullah R, et al. Phytochemical and antimicrobial properties of different plants and in silico investigation of their bioactive compounds in wound healing and rheumatism. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2024; 31 (3): 103942.
 28. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999; 12 (4): 564–82.
 29. Franyoto, YD, A. Nurrochmad, and N. Fakhrudin, *Murraya koenigii* L. Spreng.: An updated review of chemical composition, pharmacological effects, and toxicity studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2024; 14 (6): 011–027.