

# ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

**ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР** Денис Ребриков, д. б. н., профессор

**ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА** Александр Эттингер, д. м. н., профессор

**РЕДАКТОРЫ** Валентина Гейдебрект, к. б. н., Надежда Тихомирова

**ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР** Евгений Лукьянов

**ПЕРЕВОДЧИКИ** Надежда Тихомирова, Вячеслав Витюк

**ДИЗАЙН И ВЕРСТКА** Марины Дорониной

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**В. И. Аверин**, д. м. н., профессор (Минск, Белоруссия)  
**Н. Н. Алипов**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. В. Белоусов**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**М. Р. Богомилский**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. К. Божено**, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**Н. А. Былова**, к. м. н., доцент (Москва, Россия)  
**Р. Р. Гайнетдинов**, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)  
**Г. Е. Гендлин**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Е. К. Гинтер**, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)  
**Л. Р. Горбачева**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**И. Г. Гордеев**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. В. Гудков**, PhD, DSc (Буффало, США)  
**Н. В. Гуляева**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**Е. И. Гусев**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. Н. Даниленко**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**Т. В. Зарубина**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**И. И. Затевахин**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. Е. Каган**, профессор (Питтсбург, США)  
**Ю. Г. Кжышковска**, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)  
**Б. А. Кобринский**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. В. Козлов**, MD PhD (Вена, Австрия)  
**Ю. В. Котелевцев**, к. х. н. (Москва, Россия)  
**М. А. Лебедев**, PhD (Дарем, США)  
**Н. Е. Мантурова**, д. м. н. (Москва, Россия)  
**О. Ю. Милушкина**, д. м. н., доцент (Москва, Россия)  
**З. Б. Митупов**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**С. А. Мошковский**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**Д. Б. Мунблит**, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)

**В. В. Негребецкий**, д. х. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. А. Новиков**, д. б. н. (Москва, Россия)  
**Ю. П. Пивоваров**, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)  
**Н. В. Полунина**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Г. В. Порядин**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. Ю. Разумовский**, член-корр., 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)  
**Г. М. Савельева**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. Ф. Семиглазов**, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
**Н. А. Скоблина**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Т. А. Славянская**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. М. Смирнов**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)  
**А. Спаллоне**, д. м. н., профессор (Рим, Италия)  
**В. И. Стародубов**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**В. А. Степанов**, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)  
**С. В. Сучков**, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Х. П. Тахчиди**, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)  
**Г. Е. Труфанов**, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)  
**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)  
**Р. И. Якубовская**, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

**ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ** <http://vestnikrgmu.ru/login>

**ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ** [editor@vestnikrgmu.ru](mailto:editor@vestnikrgmu.ru)

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

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

Журнал включен в Scopus. CiteScore 2022: 0,5

Журнал включен в WoS. JCR 2021: 0,5

Индекс Хирша (h<sup>2</sup>) журнала по оценке Google Scholar: 8

Scopus<sup>®</sup>

WEB OF SCIENCE™

Google  
scholar

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0,14

Журнал включен в Перечень 31.01.2020 (№ 507)

Здесь находится открытый архив журнала

SJR  
Scimago Journal & Country Rank

ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)

CYBERLENINKA

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2023-02

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

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

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



Подписано в печать 30.04.2023

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

# BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

## BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

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

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

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

**TECHNICAL EDITOR** Evgeny Lukyanov

**TRANSLATORS** Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

**DESIGN AND LAYOUT** Marina Doronina

### EDITORIAL BOARD

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

**Alipov NN**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Belousov VV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Bogomilskiy MR**, corr. member of RAS, 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)

**Kobriniskii BA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Kozlov AV**, MD PhD, (Vienna, Austria)

**Kotelevtsev YuV**, CSc (Moscow, Russia)

**Lebedev MA**, PhD (Darem, USA)

**Manturova NE**, DSc (Moscow, Russia)

**Milushkina OYu**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Mitupov ZB**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Moshkovskii SA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Munblit DB**, MSc, PhD (London, Great Britain)

**Negrebetsky VV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Novikov AA**, DSc (Moscow, Russia)

**Pivovarov YuP**, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Polunina NV**, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Poryadin GV**, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Razumovskii AYU**, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Rebrova OYu**, DSc (Moscow, Russia)

**Rudoy AS**, DSc, professor (Minsk, Belarus)

**Rylova AK**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Savelieva GM**, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Semiglazov VF**, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

**Skoblina NA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Slavyanskaya TA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Smirnov VM**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Spallone A**, DSc, professor (Rome, Italy)

**Starodubov VI**, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Stepanov VA**, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)

**Suchkov SV**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Takhchidi KhP**, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Trufanov GE**, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)

**Favorova OO**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Filipenko ML**, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)

**Khazipov RN**, DSc (Marsel, France)

**Chundukova MA**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Shimanovskii NL**, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)

**Shishkina LN**, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)

**Yakubovskaya RI**, DSc, professor (Moscow, Russia)

**SUBMISSION** <http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en>

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

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

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2022: 0.5

**Scopus**<sup>®</sup>

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

**SJR**  
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

**WEB OF SCIENCE**<sup>™</sup>

Listed in HAC 31.01.2020 (№ 507)



**ВЫСШАЯ  
АТТЕСТАЦИОННАЯ  
КОМИССИЯ (ВАК)**

Five-year h-index is 8

**Google**  
scholar

Open access to archive

**CYBERLENINKA**

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2023-02

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

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

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



Approved for print 30.04.2023  
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula  
[www.print-formula.ru](http://www.print-formula.ru)

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

4

Сравнение онколитической активности рекомбинантных штаммов вируса осповакцины L1VP-RFP и MVA-RFP в отношении солидных опухолей  
Я. Шакиба, Е. Р. Набережная, Д. В. Кочетков, Г. М. Юсубалиева, П. О. Воробьев, П. М. Чумаков, В. П. Баклаушев, А. В. Липатова

Comparison of the oncolytic activity of recombinant vaccinia virus strains L1VP-RFP and MVA-RFP against solid tumors  
Shakiba Y, Naberezhnaya ER, Kochetkov DV, Yusubalieva GM, Vorobyev PO, Chumakov PM, Baklaushev VP, Lipatova AV

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

13

Прогнозирование эффективности эмбриологического этапа вспомогательных репродуктивных технологий по микробному составу эякулята  
Е. А. Паначева, Е. В. Кудрявцева, Д. Л. Зорников, Е. Э. Плотно, В. М. Петров, Е. С. Ворошилина

Predicting the blastocyst development rate during assisted reproductive technologies based on semen microbiota  
Panacheva EA, Kudryavtseva EV, Zornikov DL, Plotko EE, Petrov VM, Voroshilina ES

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

20

Генетическая характеристика штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016, выделенного от пациента с инфекцией кровотока  
А. В. Чаплин, И. А. Чагина, А. С. Пименова, Н. Т. Гадуа, Н. М. Каргальцева, О. Ю. Борисова, Е. Е. Донских, Л. И. Кафарская

Genetic characterization of *Aerococcus* sp. 1KP-2016 strain isolated from a patient with bloodstream infection  
Chaplin AV, Chagina IA, Pimenova AS, Gadua NT, Kargaltseva NM, Borisova OYu, Donskikh EE, Kafarskaya LI

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

26

Особенности реактивности  $\mu$ -ритма ЭЭГ у детей с расстройствами аутистического спектра в ситуациях помогающего поведения  
В. Б. Павленко, А. И. Кайда, В. Н. Клинков, А. А. Михайлова, Л. С. Орехова, А. А. Португальская

Features of reactivity of the EEG mu rhythm in children with autism spectrum disorders in helping behavior situations  
Pavlenko VB, Kaida AI, Klínkov VN, Mikhailova AA, Orekhova LS, Portugalskaya AA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

33

Эффект основанных на метапластичности протоколов транскраниальной стимуляции тета-вспышками на показатели рабочей памяти  
И. С. Бакулин, А. Х. Забирова, А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын, Д. Ю. Лагода, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов

Effects of the metaplasticity-based theta-burst transcranial stimulation protocols on working memory performance  
Bakulin IS, Zabirowa AH, Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Lagoda DYU, Suponeva NA, Piradov MA

**ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

42

Источники и значимость вариативности потенциалов мозга человека в интерфейсе мозг-компьютер  
И. П. Ганин, А. Н. Васильев, Т. Д. Глазова, А. Я. Каплан

Sources and impact of human brain potential variability in the brain-computer interface  
Ganin IP, Vasilyev AN, Glazova TD, Kaplan AYa

**КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ**

50

Одномоментное эндовитреальное лечение отслойки сетчатки, осложненной макулярным разрывом с кратковременной тампонадой перфторорганическим соединением  
Х. П. Тахчиди, Н. Х. Тахчиди, Н. А. Махно

Single-stage endovitrealsurgery of retinal detachment complicated by macular hole involving the short-term perfluorocarbon tamponade  
Takhchidi KhP, Takhchidi NKH, Mahno NA

**МНЕНИЕ**

56

Метаболическая инженерия — перспективный путь получения высокоэффективных продуцентов биологически активных веществ  
А. Е. Блохина, К. А. Палкина, Е. С. Шахова, А. К. Малышевская, Э. М. Осипова, Н. М. Мышкина

Metabolic engineering is a promising way to generate highly effective producers of bioactive substances  
Blokhina AE, Palkina KA, Shakhova ES, Malyshevskaya AK, Osipova ZM, Myshkina NM

## СРАВНЕНИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ L1VP-RFP И MVA-RFP В ОТНОШЕНИИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

Я. Шакиба<sup>1,2</sup>, Е. Р. Набережная<sup>1,2</sup>, Д. В. Кочетков<sup>1</sup>, Г. М. Юсубалиева<sup>1,3</sup>, П. О. Воробьев<sup>1</sup>, П. М. Чумаков<sup>1</sup>, В. П. Баклаушев<sup>1,3</sup>, А. В. Липатова<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

<sup>3</sup> Федеральное научно-клиническое учреждение здравоохранения «Федеральный научный центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия

Среди онколитических вирусов одним из наиболее изученных является вирус осповакцины (VV), штамма модифицированного высокоаттенуированного вируса Анкара (MVA), показавшего многообещающие результаты в доклинических и клинических испытаниях. Штамм Lister VV из Московского Института вирусных препаратов (L1VP) исследован в меньшей степени, чем MVA и имеет отличный от MVA тропизм. Целью работы было сравнить онколитическую эффективность штаммов L1VP и MVA в отношении солидных опухолей. Для повышения селективности L1VP и MVA к опухолевым клеткам нами были получены рекомбинантные варианты с инактивацией гена тимидинкиназы (TK), MVA-RFP и L1VP-RFP, экспрессирующие красный флуоресцентный белок. Кинетику репликации и онколитическую активность полученных рекомбинантных штаммов оценивали *in vitro* и *in vivo* на линиях опухолевых клеток и аллотрансплантатах мышечных сингенных моделей метастатической аденокарциномы молочной железы мыши 4T1, аденокарциномы толстой кишки CT26 и меланомы B16. Как MVA-RFP, так и L1VP-RFP показали высокую эффективность репликации в опухолевых клетках и выраженную онколитическую активность в отношении аллотрансплантатов меланомы B16 и аденокарциномы молочной железы 4T1. В отношении 4T1, являющейся моделью тройного негативного рака молочной железы человека, L1VP-RFP по сравнению с MVA-RFP показал более чем на 50% повышенную цитотоксичность в тестах *in vitro*, а также достоверное замедление прогрессирования аллотрансплантатов 4T1 и повышение выживаемости животных в экспериментах *in vivo*. Применение штамма L1VP в качестве платформы при разработке рекомбинантных онколитических вирусов для терапии рака молочной железы может быть более перспективным, чем применение штамма MVA.

**Ключевые слова:** вирус осповакцины, L1VP, MVA, вирусная онколитическая терапия, рак молочной железы, карцинома толстой кишки, меланома

**Финансирование:** разработка онколитических вирусов и эксперименты *in vitro* были выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант РФФИ № 20-75-10157); эксперименты *in vivo* также выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант РФФИ № 22-64-00057).

**Вклад авторов:** Я. Шакиба — анализ литературы, выполнение преаналитического этапа работы, проведение экспериментов *in vitro* и *in vivo*, анализ и интерпретация данных, подготовка рисунков и графиков; Е. Р. Набережная — проведение экспериментов *in vitro*, анализ и интерпретация данных; Д. В. Кочетков — уход за животными, интерпретация данных; Г. М. Юсубалиева — визуализация данных, редактирование рукописи; П. О. Воробьев — наработка препаративных количеств вируса для *in vivo* исследований; В. П. Баклаушев — планирование исследования, выполнение преаналитического этапа работы, анализ данных; А. В. Липатова, П. М. Чумаков — руководство исследованием, разработка дизайна, создание рекомбинантных штаммов, интерпретация данных, редактирование рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ИМБ РАН (протокол № 3 от 27 октября 2022 г.). Эксперименты проводили в соответствии с директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС о защите животных, используемых для исследований.

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

**Статья получена:** 20.02.2023 **Статья принята к печати:** 02.04.2023 **Опубликована онлайн:** 28.04.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.010

## COMPARISON OF THE ONCOLYTIC ACTIVITY OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS STRAINS L1VP-RFP AND MVA-RFP AGAINST SOLID TUMORS

Shakiba Y<sup>1,2</sup>, Naberezhnaya ER<sup>1,2</sup>, Kochetkov DV<sup>1</sup>, Yusubalieva GM<sup>1,3</sup>, Vorobyev PO<sup>1</sup>, Chumakov PM<sup>1</sup>, Baklaushchev VP<sup>1,3</sup>, Lipatova AV<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

<sup>3</sup> Federal Research and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russia

Among oncolytic viruses, modified vaccinia virus Ankara (MVA), a highly attenuated vaccinia virus (VV) is a well-studied variant with promising results in preclinical and clinical trials. The Lister VV strain from the Moscow Institute of Viral Preparations (L1VP) has been studied to a lesser extent than MVA and has a different oncolytic property from MVA. The aim of this work was to compare the oncolytic efficacy of L1VP and MVA strains against solid tumors. We developed recombinant variants L1VP-RFP and MVA-RFP; to enhance onco-selectivity thymidine kinase (TK) gene was inactivated by insertion of red fluorescent protein (RFP) gene to the TK locus. The replication kinetics and oncolytic activity of the obtained recombinant strains were evaluated *in vitro* and *in vivo* on tumor cell lines and mouse syngeneic tumor models of metastatic mouse 4T1 mammary adenocarcinoma, CT26 colon adenocarcinoma, and B16 melanoma. Both MVA-RFP and L1VP-RFP showed high replication efficiency in tumor cells and pronounced oncolytic activity against B16 melanoma and 4T1 breast adenocarcinoma allografts. In relation to 4T1, which is a model of triple negative human breast cancer, L1VP-RFP showed more than 50% increased cytotoxicity in *in vitro* tests compared to MVA-RFP, as well as a significant slowdown in the progression of 4T1 allografts and an increase in animal survival in experiments *in vivo*. Thus, the L1VP strain may be more promising than MVA as a platform for the development of recombinant oncolytic viruses for the breast cancer treatment.

**Keywords:** vaccinia virus, L1VP, MVA, viral oncolytic therapy, breast cancer, colon carcinoma, melanoma

**Funding:** the development of oncolytic viruses and *in vitro* experiments were supported by the Russian Science Foundation (Russian Science Foundation grant № 20-75-10157); *in vivo* experiments were also supported by the Russian Science Foundation (Russian Science Foundation grant № 22-64-00057).

**Author contribution:** Ya Shakiba — literature analysis, pre-analytical work, *in vitro* and *in vivo* experiments, analysis and interpretation of data, preparation of figures and graphs; ER Naberezhnaya — *in vitro* experiments, data analysis and interpretation; DV Kochetkov — animal care, data interpretation; GM Yusubalieva — data visualization, manuscript editing; PO Vorobyev — production of preparative quantities of the virus for *in vivo* studies; VP Baklaushchev — study planning, preanalytical stage of work, data analysis; AV Lipatova, PM Chumakov — research management, design development of recombinant strains, data interpretation, editing the manuscript.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the ethics committee of the EIMB RAS (protocol № 3 dated October 27, 2022). Experiments carried out in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of Europe on the protection of animals used for research.

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

**Received:** 20.02.2023 **Accepted:** 02.04.2023 **Published online:** 28.04.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.010

Онколитические вирусы представляют собой новый класс препаратов для лечения злокачественных новообразований, устойчивых к классическим подходам противоопухолевой терапии. Онколитические вирусы избирательно инфицируют опухолевые клетки, вызывая прямой цитопатический эффект и опосредованную активацию цитотоксических клеток, что в итоге приводит к регрессии опухоли [1]. Вирус осповакцины (VV) представляет собой онколитический вектор с превосходными характеристиками, включающими высокую тропность и цитолитическую активность в отношении опухолевых клеток, быструю репликацию без интеграции в геном клетки-хозяина, устойчивость к гипоксическому микроокружению опухоли и хорошо охарактеризованный профиль безопасности [2, 3].

Штамм L1VP продемонстрировал значительную цитотоксическую активность в отношении опухолей различной гистологической принадлежности (колоректальный рак, рак желудка, злокачественные мезотелиомы, рак легких, рак щитовидной и молочной железы) [4, 5]. Было исследовано и биораспределение штамма L1VP — вирус избирательно заражает опухолевые клетки без обнаружения его в яичниках, селезенке или тканях мозга после внутривенной инъекции [6, 7]. Вирус осповакцины экспрессирует несколько иммуномодулирующих белков для маскировки от иммунного ответа организма, например, рецепторы-приманки интерферона или ингибиторы регуляторных путей врожденного иммунитета, таких как toll-подобные рецепторы или сигналинг NF- $\kappa$ B [8]. Сообщалось, что штамм Lister кодирует больше генов, участвующих в уклонении от иммунного ответа, таких как A53R, рецептор растворимого фактора некроза опухоли, или T1/35кДа — ингибитор CC-хемокинов, которые отсутствуют в других штаммах, таких как MVA или WR (Western Reserve) [9, 10]. L1VP является биовариантом английского штамма Lister, полученным путем его адаптации в коже теленка [11]. Этот штамм частично использовали в программе ликвидации оспы после 1971 г., и, как сообщается, он обладает онколитическими свойствами и значительно меньшей вирулентностью по сравнению с другими биовариантами штамма Lister [12, 13], кроме этого, он не был изучен в ряде доклинических и клинических исследований [14–19].

Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) является одним из самых широко изученных штаммов VV с многообещающими перспективами в онколитической вирусной терапии. MVA — высокоаттенуированный штамм; он плохо реплицируется в клетках человека, и его способность к репродукции в основном ограничена эмбриональными клетками птиц, что делает его весьма безопасным [20]. Кроме того, MVA является мощным индуктором интерферонов I типа и вызывает сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Эти свойства MVA делают его важным кандидатом для разработки противоопухолевой терапии [20]. MVA одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в качестве безопасной вакцины против оспы [21]. Кроме того, рекомбинантный вариант вакцинного вектора MVA-BN был одобрен Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) в составе вакцины против лихорадки Эбола и его активно используют в клинических испытаниях инфекционных заболеваний и иммунотерапии опухолей [22].

В данном исследовании мы получили рекомбинантные штаммы MVA-RFP и L1VP-RFP с инактивацией вирусного

гена тимидинкиназы (TK) для повышения специфичности к опухолевым клеткам [23] путем вставки репортерного гена tagRFP (красный флуоресцентный белок) в область делегируемого гена. Инактивация гена TK делает репликацию вируса зависимой от клеточной TK, которая экспрессируется только во время S-фазы клеточного цикла, в то время как трансформированные клетки постоянно ее экспрессируют. Так, рекомбинантные вирусы с дефектным геном TK избирательно реплицируются в быстро делящихся опухолевых клетках, постоянно экспрессирующих клеточную тимидинкиназу [24].

Целью работы было сравнить онколитическую эффективность MVA-RFP и L1VP-RFP в солидных опухолях мышинных сингенных моделей аденокарциномы молочной железы 4T1, меланомы B16 и карциномы толстой кишки CT26.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

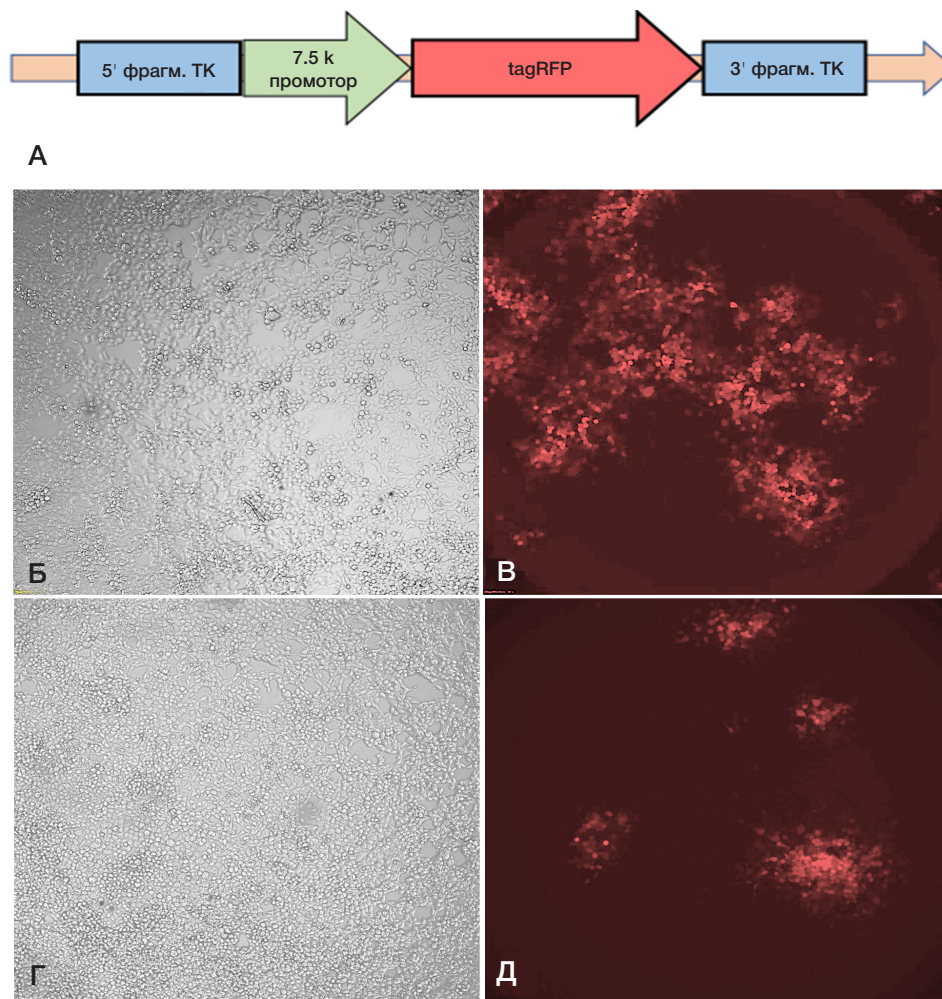
### Культуры клеток

Клетки почки хомячка ВНК-21 (ATCC № CCL-10), карциномы толстой кишки CT26 (ATCC № CRL-2639), аденокарциномы молочной железы 4T1 (ATCC № CRL-3406), меланомы B16 (ATCC № CRL-6475) и линии клеток HEK293T (ATCC № CRL-3216) приобретены в Американской коллекции культур (ATCC; США). Крысиные фибробласты с дефицитом TK (Rat2 TK-/-) были взяты из коллекции Лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН (Москва, Россия). Все клетки культивировали в среде DMEM с добавлением глутамина (Gibco; США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Gibco; США), и инкубировали при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

### Вирусы

Вирус осповакцины штамма L1VP (ЛИВП) был получен из коллекции Лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН (Москва, Россия). Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) (ATCC № VR-1508) приобретен в ATCC.

Для конструирования штаммов MVA-RFP и L1VP-RFP была получена инсерционная плаزمиды, несущая ген tagRFP. Последовательность гена tagRFP амплифицировали методом ПЦП с плазмидной конструкции pTagRFP-C («Евроген»; Россия) с использованием праймеров 5-AGAGAG CCTGGATGGTGTCTAAGGGCGAAGAG и 5-AGAGAGGGAT CCTTAATTAAGTTTGTGCCCCAGTTTG («Евроген»; Россия). tagRFP экспрессировали под контролем 7.5k-промотора. Рамку фланкировали участками гена TK, исходная плазмидная конструкция для рекомбинации была создана в Лаборатории пролиферации клеток ИМБ РАН (Москва, Россия) [6]. Рекомбинантные штаммы получали путем липофекции клеток HEK293T реагентом Lipofectamine 3000 (Thermo Fischer; США) и последующим инфицированием штаммом осповакцины дикого типа. Спустя 48 ч готовили криолизат инфицированных клеток и проводили селекцию вирусных частиц на клетках Rat-2 TK-/-, обработанных бромдезоксипуридином в концентрации 25 мкг/мл [24]. После нескольких раундов селекции вирус клонировали методом бляшек для очистки от дикого штамма. Полученные рекомбинантные штаммы нарабатывали в клетках ВНК-21 и очищали методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [25]. Правильность вставок в рекомбинантных вариантах была подтверждена



**Рис. 1.** Характеристика рекомбинантных штаммов LVP-RFP и MVA-RFP *in vitro*. **А.** Схема плазмидного вектора, используемого при разработке штаммов LVP-RFP и MVA-RFP. **Б, В.** Флуоресцентная микроскопия клеток HEK293T, инфицированных рекомбинантным штаммом LVP-RFP. **Г, Д.** Флуоресцентная микроскопия HEK293T, инфицированных MVA-RFP (увеличение  $\times 100$ )

секвенированием соответствующего участка генома по Сэнгеру. Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (Thermo Fischer; США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo Fischer; США) в Центре коллективного пользования «Геном» ИМБ РАН.

#### Титрование вируса

Клетки ВНК-21 рассеивали по 10 000 клеток на лунку в 96-луночный планшет, на следующий день среду удаляли и клетки инфицировали 10-кратными разведениями вирусов и инкубировали в среде DMEM с добавлением 2% FBS. Через 48 ч, когда развивалось цитопатическое действие, 50%-ю инфекционную дозу культуры ткани (TCID<sub>50</sub>) оценивали по методу Рида и Менча [26].

#### Оценка цитотоксической активности вирусов

Клетки 4T1, В16, СТ26 и ВНК-21 высевали по 10 000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты, затем инфицировали множественностью 1 и 10 БОЕ/кл. штаммами MVA-RFP или LVP-RFP. Оценку цитотоксической активности проводили с использованием МТТ-теста через 24, 48 и 72 ч после заражения. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали как соотношение жизнеспособности клеток

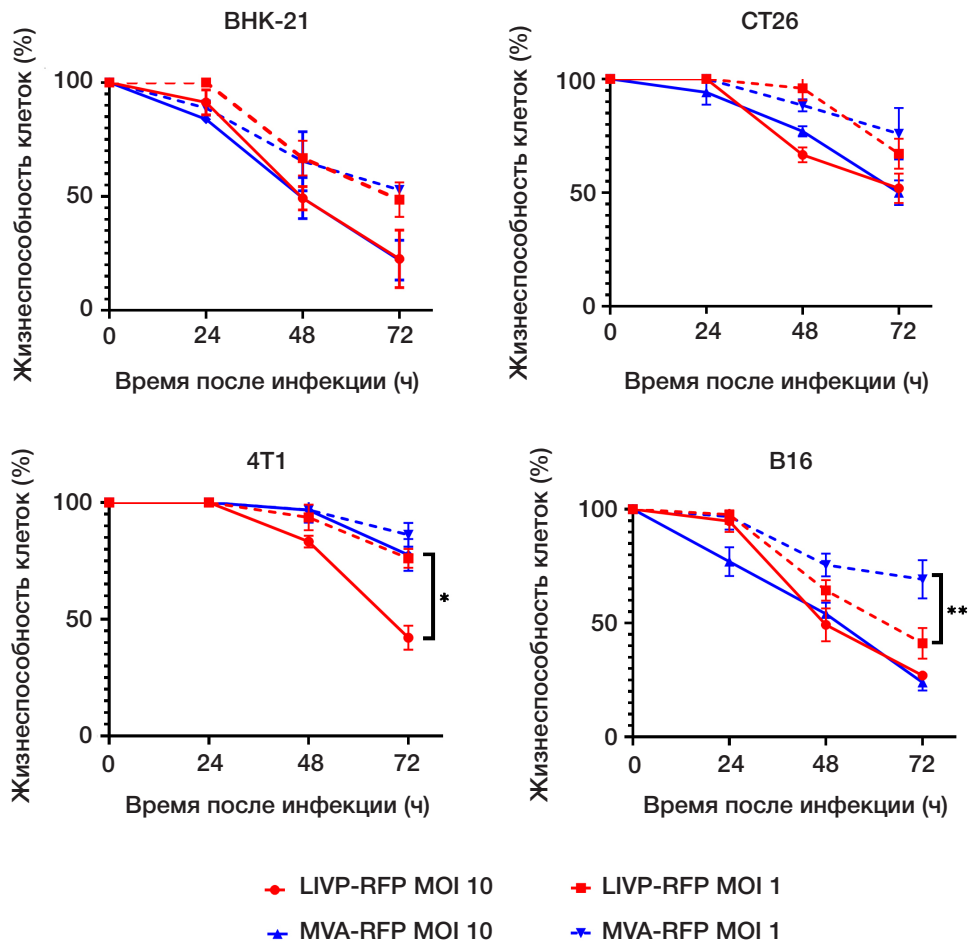
в инфицированных лунках к жизнеспособности клеток в неинфицированных контрольных лунках и умножения на 100 [27].

#### Оценка скорости репликации вируса методом проточной цитометрии

Уровень экспрессии RFP в зараженных клетках коррелирует с уровнем вирусной репликации. Клетки 4T1, В16, СТ26 и ВНК-21 высевали по 100 000 клеток на лунку в 24-луночные планшеты, на следующий день инфицировали штаммами MVA-RFP или LVP-RFP с MOI 1 и 10, затем снимали с подложки с помощью трипсина и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением 2% через 24 и 48 ч после инфицирования и измеряли количество ярко флуоресцирующих в диапазоне RFP клеток с использованием цитофлуориметра BD LSRFortessa Cell Analyser (Beckman Dickinson; США). Анализ выполняли с помощью Flowing Software 2.0 (Perttu Terho; Финляндия). Результаты основаны на трех независимых экспериментах с тремя повторами, не менее 10 000 событий на образец.

#### Оценка онколитической активности вирусов *in vivo*

В экспериментах использовали шестинедельных самок мышей BALB/c и C57BL/6. Мыши имели свободный



**Рис. 2.** Цитотоксичность рекомбинантных штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP в различных культурах опухолевых клеток. Клетки BHK-21, B16, CT26 и 4T1 инфицировали с MOI 1 и 10 вирусами LIVP-RFP и MVA-RFP и оценивали жизнеспособность клеток с использованием МТТ-анализа в течение 24, 48 и 72 ч после заражения. Статистический анализ проводили с помощью *t*-теста; \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$

доступ к пище и воде и находились в стандартных условиях с контролируемой температурой (21–23 °C) и вентиляцией воздуха, а также световым режимом 12/12 ч. Для формирования опухолей  $10^6$  клеток карциномы толстой кишки CT26 или рака молочной железы 4T1 имплантировали подкожно в правый бок мышей BALB/c, а  $10^6$  клеток меланомы B16 имплантировали в правый бок мышей C57BL/6. До начала виротерапии мышей с верифицированными опухолевыми аллотрансплантатами клеток CT26 ( $n = 15$ ), 4T1 ( $n = 15$ ) и B16 ( $n = 15$ ) делили на три подгруппы ( $n = 5$  в каждой). Вирусы вводили на 7-й и 9-й дни после имплантации опухоли посредством внутриопухолевой инъекции в 20 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) («ПанЭко»; Россия). В экспериментальных подгруппах с аллотрансплантатами CT26, 4T1 и B16 делали внутриопухолевые инъекции, доза вируса составила  $5 \times 10^7$  БОЕ. Контрольные подгруппы получали внутриопухолевые инъекции фосфатно-солевого буфера. Объем опухоли измеряли по модифицированной эллипсоидальной формуле:  $V = \frac{1}{2}$  (длина  $\times$  ширина<sup>2</sup>) [28] каждые два дня до достижения опухоли объема 2000 мм<sup>3</sup>. После достижения максимально допустимого объема мышей подвергали эвтаназии и на основе этих данных строили кривые выживаемости.

#### Статистический анализ

Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Статистический анализ

проводили с использованием непарных *t*-тестов и двухфакторного дисперсионного анализа, различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для подготовки всех графиков и проведения статистического анализа использовали программу GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc.; США).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Конструирование рекомбинантных вирусов

Штаммы LIVP-RFP и MVA-RFP с инактивацией ТК, содержащие вставку красного флуоресцентного белка (tagRFP), были созданы путем рекомбинации вирусного генома с плазмидной конструкцией. Флуоресцентная микроскопия клеток HEK293T, инфицированных рекомбинантными штаммами LIVP-RFP и MVA-RFP, показала, что вирусы реплицируются и продуцируют функционально активный RFP (рис. 1).

##### Цитотоксическая активность штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP в отношении опухолевых клеток мышей

Цитотоксическую активность рекомбинантных штаммов вируса осповакцины LIVP-RFP и MVA-RFP оценивали в течение 72 ч с помощью МТТ-теста в культурах клеток меланомы мыши B16, карциномы толстой кишки CT26 и аденокарциномы молочной железы 4T1 мыши, а также в чувствительной к W клеточной линии BHK-21, которую

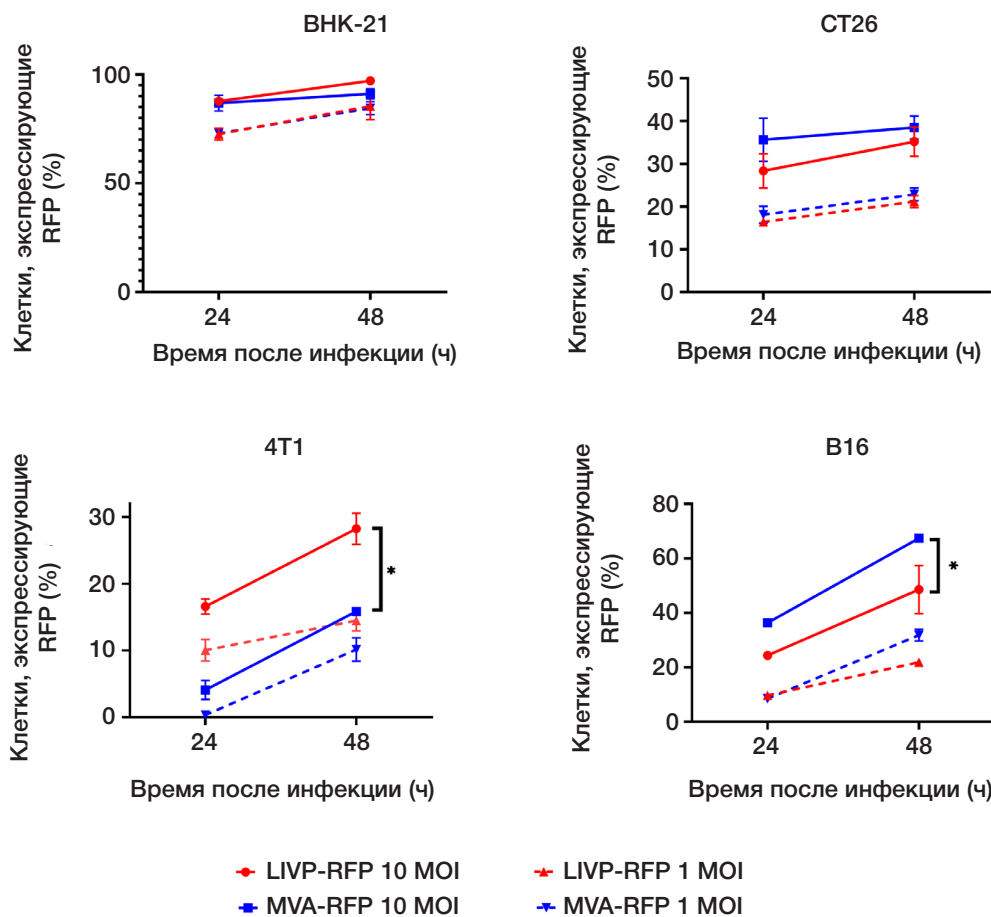


Рис. 3. Эффективность репликации вирусных штаммов в клеточных линиях BHK-21, B16, CT26, 4T1, инфицированных MOI 1 и 10 LIVP-RFP и MVA-RFP на основе результатов проточной цитофлуориметрии через 24 и 48 ч. По оси ординат отложено число клеток в процентах, экспрессирующих RFP. Статистический анализ проводили с помощью *t*-теста; \* —  $p < 0,05$

мы использовали в качестве положительного контроля. В культуре BHK-21 штаммы LIVP-RFP и MVA-RFP через 72 ч вызвали более чем 75% гибель клеток при MOI 10 и более 50% гибель при множественности инфекции 1 (MOI 1) (рис. 2). Наиболее чувствительной из исследованных линий метастатических опухолей оказалась меланома B16, в культуре которой наблюдали 50% гибель клеток спустя 72 ч после инфицирования MOI 10 LIVP-RFP или MVA-RFP (рис. 2B; сплошные линии). При инфицировании B16 MOI 1 рекомбинантный штамм LIVP-RFP показал достоверно более высокую цитотоксичность через 72 ч, по сравнению с MVA-RFP (рис. 2; пунктирные линии). Наиболее резистентной к онколитической виротерапии оказалась линия колоректальной карциномы CT26, в культуре которой наблюдалась менее чем 50%-я клеточная гибель при множественности инфекции 10 LIVP-RFP или MVA-RFP (рис. 2). В аденокарциноме молочной железы 4T1 цитопатическое действие выявлено только при инфекции множественностью 10. При этом для штамма LIVP-RFP отмечена значимо более высокая цитотоксичность (>50%) по сравнению с MVA-RFP (рис. 2).

#### Оценка вирусной репликации методом проточной цитометрии

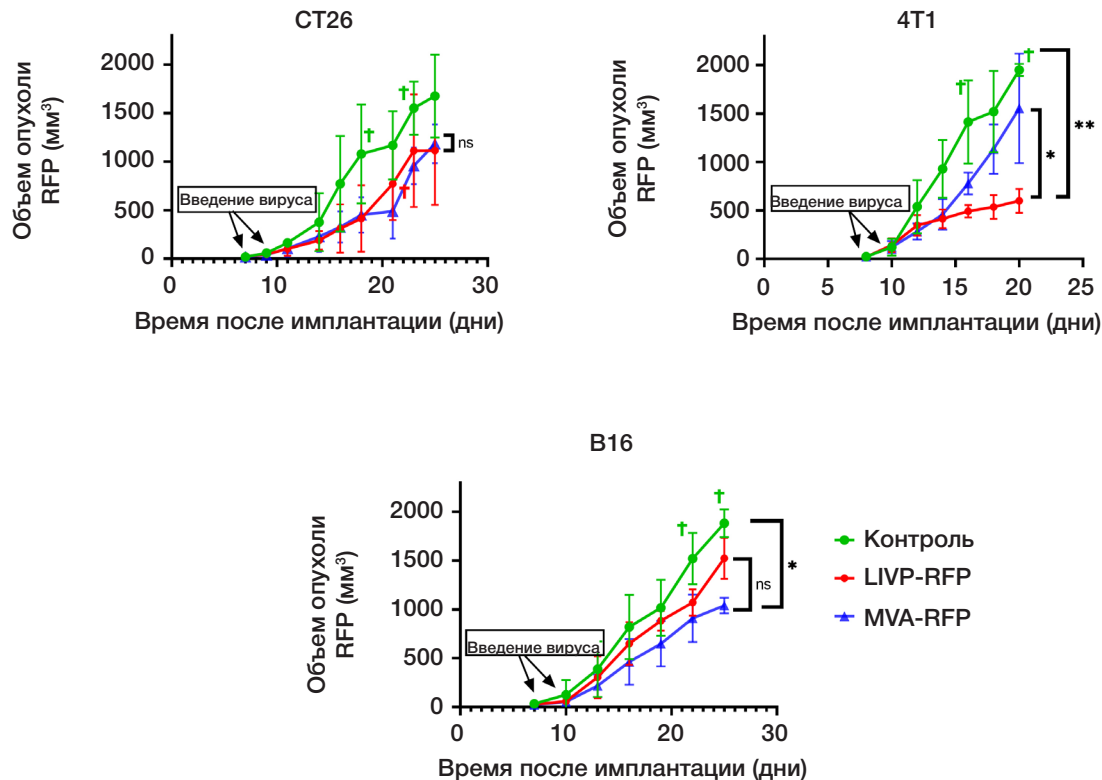
Эффективность репликации вирусных штаммов в исследуемых клеточных линиях оценивали по количеству флуоресцирующих RFP-положительных клеток, которое определяли с помощью проточной цитометрии. Было обнаружено, что уровень инфицирования контрольной

линии BHK-21 уже через 24 ч приближается к 100% и существенно не меняется через 48 ч (рис. 3). В клеточной линии меланомы B16 наблюдалось увеличение количества RFP-положительных клеток, причем достоверно более высокую эффективность репликации показал штамм MVA-RFP, который инфицировал более 60% клеток в течение 48 ч. Линия аденокарциномы молочной железы 4T1, наоборот, характеризовалась самой низкой эффективностью репликации штаммов вируса осповакцины, при этом наибольший уровень заражения мы наблюдали при инфицировании штаммом LIVP-RFP и он достигал почти 30% через 48 ч. Эффективность вирусной репликации в культуре клеток CT26 (около 40% для MOI 10) не различалась между штаммами LIVP-RFP и MVA-RFP.

#### Оценка противоопухолевой активности штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP в экспериментах *in vivo*

Онколитическую активность рекомбинантных штаммов LIVP-RFP и MVA-RFP исследовали на мышах BALB/c с аллогraftами карцином молочной железы 4T1 или толстой кишки CT26, а также на мышах C57BL/6 с аллогraftами меланомы B16. Двукратное внутриопухолевое введение онколитических вирусов на 7-й и 9-й дни после инокуляции опухоли приводило к замедлению роста опухоли (рис. 4) и повышению выживаемости животных (рис. 5) во всех группах, получавших как LIVP-RFP, так и MVA-RFP, по сравнению с контрольными группами, которым вводили PBS. Наиболее заметное замедление роста опухоли обнаружено в случае терапии аллогraftов меланомы B16





**Рис. 4.** Динамика изменения объема опухоли у мышей с аллогraftами карциномы толстой кишки CT26, карциномы молочной железы 4T1 и меланомы B16 после терапии рекомбинантными штаммами LVP-RFP или MVA-RFP. Измерение опухоли проводили каждые два дня после лечения. Символ † указывает на эвтаназию животного. Статистический анализ проводили с помощью *t*-теста; \* —  $p < 0,05$ , ns — отсутствие статистически достоверных различий

с помощью внутриопухолевого введения MVA-RFP, а также аллогraftов карциномы 4T1 при введении LVP-RFP, что полностью соответствовало результатам, полученным *in vitro*. Выживаемость в подгруппах 4T1 и B16 (после применения виротерапии) была достоверно выше, по сравнению с контролем, при этом животные, получавшие LVP-RFP, имели большую продолжительность жизни, чем в подгруппах MVA-RFP (рис. 5). Прогрессирование карциномы CT26 никак не изменялось при терапии как LVP-RFP, так и MVA-RFP (рис. 4), хотя в обеих экспериментальных подгруппах наблюдалось увеличение выживаемости животных, получивших инъекции рекомбинантных вирусов (рис. 5).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном сравнительном исследовании мы оценили цитотоксичность, способность к репликации *in vitro*, а также терапевтический потенциал в отношении солидных мышинных опухолей *in vivo* рекомбинантных штаммов LVP-RFP и MVA-RFP, созданных на основе штаммов вируса осповакцины LVP и MVA соответственно и содержащих вставку одного и того же гена красного флуоресцентного белка в структурной части гена вирусной тимидинкиназы.

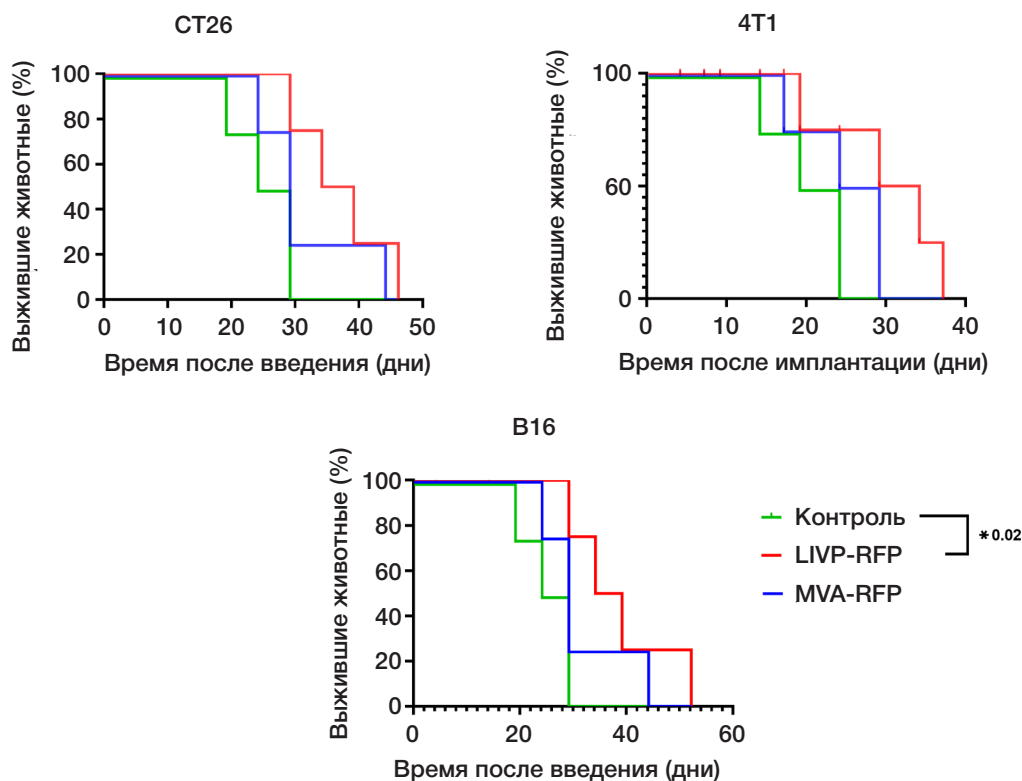
Эффективность терапии онколитическими вирусами складывается из двух основных компонентов: активации иммунной системы в ответ на введение вирусов и прямого цитотоксического действия вирусов на опухолевые клетки [29]. Активация иммунокомпетентных цитотоксических CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, CD56<sup>+</sup>-NK-клеток и тканевых макрофагов имеет критически важное значение в связи с тем, что наиболее резистентные и злокачественные опухоли характеризуются наиболее выраженным иммуносупрессивным действием на опухолевое микроокружение [30]. Поэтому системное или внутриопухолевое введение вирусных частиц,

заражающих опухолевые клетки и активирующих антиген-презентирующие клетки, сопровождается повышенной продукцией воспалительных цитокинов и рекрутингом цитотоксических иммунных клеток, что в итоге может замедлять прогрессию опухоли. К противоопухолевым иммунным реакциям добавляется прямое цитопатическое действие онколитических вирусов на опухолевые клетки вследствие повышенной скорости пролиферации, ингибированием апоптоза и другими онкогенными механизмами [30].

Одним из ключевых затруднений применения онколитических вирусов для терапии является выраженный иммунный ответ хозяина на вирусную инфекцию, вызывающий неблагоприятные побочные эффекты и снижающий эффективность виротерапии. Поксвирусы уникальны по своей способности уклоняться от иммунного ответа хозяина, что делает их в целом безопасными для использования в терапии, в частности, штамм *Lister* доказал свою высокую безопасность для людей, поскольку его использовали во время программы ликвидации оспы во всем мире [7, 31]. Было показано, что этот штамм индуцирует меньше провоспалительных цитокинов, таких как IL8, IL6 и IFN $\gamma$ , у хозяина и вызывает более высокий уровень противовоспалительных цитокинов, таких как IL10, по сравнению с другими штаммами, такими как WR [5, 32].

Усиление онкоселективности вируса ограничивает вирусную инфекцию в месте опухоли и предотвращает заражение других органов, что приводит к меньшим воспалительным побочным эффектам. Одной из стратегий повышения избирательности опухоли и снижения вирулентности вируса осповакцины является делеция гена вирусной тимидинкиназы [33].

В нашем исследовании мы показали, что LVP-RFP более эффективно реплицируется и лизирует клетки 4T1 по сравнению со штаммом MVA-RFP. В последующих



**Рис. 5.** Кривые выживания Каплана–Мейера в экспериментальных подгруппах мышей с аллографтами аденокарцином CT26, 4T1 и меланомы B16 после двукратной внутриопухолевой инъекции рекомбинантных вирусов LVP-RFP или MVA-RFP. Таким образом, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* получены данные, подтверждающие онколитическую активность рекомбинантного штамма LVP-RFP в отношении модели аденокарциномы молочной железы 4T1

экспериментах *in vivo* нам удалось продемонстрировать взаимосвязь между способностью вируса к репликации в опухолевых клетках *in vitro* и его способностью замедлять прогрессирование опухоли *in vivo*. Достоверно меньший объем опухолевых аллографтов аденокарциномы 4T1 и увеличение выживания животных после терапии LVP-RFP по сравнению с MVA-RFP свидетельствуют о более выраженной онколитической активности LVP-RFP по отношению к аденокарциноме 4T1.

Линия клеток рака молочной железы 4T1 представляет собой высокоинвазивную и метастатическую клеточную модель тройного негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) [34]. ТНРМЖ считают наиболее агрессивной формой рака молочной железы с самым неблагоприятным прогнозом и отсутствием целевых вариантов лечения

[35]. Наши результаты показывают, что штамм LVP обладает большим потенциалом для лечения ТНРМЖ по сравнению с MVA.

## Выводы

Сравнительное исследование онколитических свойств штаммов LVP-RFP и MVA-RFP с инактивированным геном тимидинкиназы показало, что штамм LVP-RFP более эффективен для онколитической виротерапии рака молочной железы 4T1. Применение штамма LVP в качестве платформы для разработки рекомбинантных онколитических вирусов для терапии трипл-негативного рака молочной железы может быть более перспективным, чем применение штамма MVA.

## Литература

1. Thorne SH, Hwang TH, Kirn DH. Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer. *Curr Opin Mol Ther.* 2005; 7 (4): 359–65.
2. Ho TY, et al. Deletion of immunomodulatory genes as a novel approach to oncolytic vaccinia virus development. *Mol Ther Oncolytics.* 2021; 22: 85–97.
3. Kirn DH, et al. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res.* 2008; 68 (7): 2071–5.
4. Haddad D, et al. A novel genetically modified oncolytic vaccinia virus in experimental models is effective against a wide range of human cancers. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19: 665–74.
5. Hughes J, et al. Lister strain vaccinia virus with thymidine kinase gene deletion is a tractable platform for development of a new generation of oncolytic virus. *Gene Ther.* 2015; 22 (6): 476–84.
6. Shakiba Y, et al. Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models. *Viruses.* 2023; 15 (4): 828. DOI: 10.3390/v15040828.
7. Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin–angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl 1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther.* 2011; 22 (9): 1101–8.
8. Smith GL. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Lett.* 1999; 65 (1–2): 55–62.
9. Bahar MW, et al. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol.* 2011; 175 (2): 127–34.
10. Smith GL, et al. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol.* 2013; 94 (11): 2367–92.
11. Shvalov AN, et al. Complete genome sequence of vaccinia virus strain L-IVP. *Genome Announc.* 2016; 4 (3): e00372–16.
12. Gentschev I, et al. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. 2012; 7 (5): e37239.
13. Shchelkunov SN, et al. Enhancing the protective immune

- response to administration of a LVP-GFP live attenuated vaccinia virus to mice. *PLoS One*. 2021; 10 (3): 377.
14. Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7 (45): 74171.
  15. Zonov E, et al. Features of the antitumor effect of vaccinia virus lister strain. *Viruses*. 2016; 8 (1): 20.
  16. Koval O, et al. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 3620510. DOI: 10.1155/2017/3620510.
  17. Tkacheva A, et al. Targeted therapy of human glioblastoma combining the oncolytic properties of parvovirus H-1 and attenuated strains of the vaccinia virus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2019; 37 (2): 83–91.
  18. Gholami S, et al. Vaccinia virus GLV-1h153 is a novel agent for detection and effective local control of positive surgical margins for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013; 15 (2): R26.
  19. Holloway R, et al. 837P Phase II trial of oncolytic vaccinia virus primed immunochemotherapy in platinum-resistant/refractory ovarian cancer (PRROC)(NCT02759588). *Annals of Oncology*. 2020; 31: 628.
  20. Suter M, et al. Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine*. 2009; 27 (52): 7442–50.
  21. Pittman PR, et al. Phase 3 efficacy trial of modified vaccinia Ankara as a vaccine against smallpox. *N Engl J Med*. 2019; 381 (20): 1897–908.
  22. Gatti-Mays ME, et al. A phase I dose-escalation trial of BN-CV301, a recombinant poxviral vaccine targeting MUC1 and CEA with costimulatory molecules. *Clin Cancer Res*. 2019; 25 (16): 4933–44.
  23. Parato KA, et al. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther*. 2012; 20 (4): 749–58.
  24. Byrd CM, et al. Construction of recombinant vaccinia virus: cloning into the thymidine kinase locus. *Methods Mol Biol*. 2004: 31–40.
  25. Cotter CA, et al. Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks. *Curr Protoc Mol Biol*. 2017; 117 (1): 16.16.1–16.16.18.
  26. Ramakrishnan MAJ. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016; 5 (2): 85.
  27. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol*. 1998: 179–84.
  28. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989; 24: 148–54.
  29. Cottingham MG, Carroll MW. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. *Vaccine*. 2013; 31 (39): 4247–51.
  30. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6 (10): 715–27.
  31. Thorne SH. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. *Immunol Res*. 2011; 50: 286–93.
  32. Matsuda T, et al. A comparative safety profile assessment of oncolytic virus therapy based on clinical trials. *Ther Innov Regul Sci*. 2018; 52 (4): 430–7.
  33. Buller RML, et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature*. 1985; 317 (6040): 813–5.
  34. Schrörs B, et al. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Front Oncol*. 2020; 10: 1195.
  35. Li Z, et al. Immunotherapeutic interventions of triple negative breast cancer. *J Transl Med*. 2018; 16 (1): 147.

## References

1. Thorne SH, Hwang TH, Kim DH. Vaccinia virus and oncolytic virotherapy of cancer. *Curr Opin Mol Ther*. 2005; 7 (4): 359–65.
2. Ho TY, et al. Deletion of immunomodulatory genes as a novel approach to oncolytic vaccinia virus development. *Mol Ther Oncolytics*. 2021; 22: 85–97.
3. Kirn DH, et al. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res*. 2008; 68 (7): 2071–5.
4. Haddad D, et al. A novel genetically modified oncolytic vaccinia virus in experimental models is effective against a wide range of human cancers. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19: 665–74.
5. Hughes J, et al. Lister strain vaccinia virus with thymidine kinase gene deletion is a tractable platform for development of a new generation of oncolytic virus. *Gene Ther*. 2015; 22 (6): 476–84.
6. Shakiba Y, et al. Oncolytic efficacy of a recombinant vaccinia virus strain expressing bacterial flagellin in solid tumor models. *Viruses*. 2023; 15 (4): 828. DOI: 10.3390/v15040828.
7. Tysome JR, et al. Lister vaccine strain of vaccinia virus armed with the endostatin–angiostatin fusion gene: an oncolytic virus superior to dl 1520 (ONYX-015) for human head and neck cancer. *Hum Gene Ther*. 2011; 22 (9): 1101–8.
8. Smith GL. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Lett*. 1999; 65 (1–2): 55–62.
9. Bahar MW, et al. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol*. 2011; 175 (2): 127–34.
10. Smith GL, et al. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol*. 2013; 94 (11): 2367–92.
11. Shvalov AN, et al. Complete genome sequence of vaccinia virus strain L-IVP. *Genome Announc*. 2016; 4 (3): e00372–16.
12. Gentshev I, et al. Preclinical evaluation of oncolytic vaccinia virus for therapy of canine soft tissue sarcoma. 2012; 7 (5): e37239.
13. Shchelkunov SN, et al. Enhancing the protective immune response to administration of a LVP-GFP live attenuated vaccinia virus to mice. *PLoS One*. 2021; 10 (3): 377.
14. Kochneva G, et al. Engineering of double recombinant vaccinia virus with enhanced oncolytic potential for solid tumor virotherapy. *Oncotarget*. 2016; 7 (45): 74171.
15. Zonov E, et al. Features of the antitumor effect of vaccinia virus lister strain. *Viruses*. 2016; 8 (1): 20.
16. Koval O, et al. Recombinant vaccinia viruses coding transgenes of apoptosis-inducing proteins enhance apoptosis but not immunogenicity of infected tumor cells. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 3620510. DOI: 10.1155/2017/3620510.
17. Tkacheva A, et al. Targeted therapy of human glioblastoma combining the oncolytic properties of parvovirus H-1 and attenuated strains of the vaccinia virus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2019; 37 (2): 83–91.
18. Gholami S, et al. Vaccinia virus GLV-1h153 is a novel agent for detection and effective local control of positive surgical margins for breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013; 15 (2): R26.
19. Holloway R, et al. 837P Phase II trial of oncolytic vaccinia virus primed immunochemotherapy in platinum-resistant/refractory ovarian cancer (PRROC)(NCT02759588). *Annals of Oncology*. 2020; 31: 628.
20. Suter M, et al. Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine*. 2009; 27 (52): 7442–50.
21. Pittman PR, et al. Phase 3 efficacy trial of modified vaccinia Ankara as a vaccine against smallpox. *N Engl J Med*. 2019; 381 (20): 1897–908.
22. Gatti-Mays ME, et al. A phase I dose-escalation trial of BN-CV301, a recombinant poxviral vaccine targeting MUC1 and CEA with costimulatory molecules. *Clin Cancer Res*. 2019; 25 (16): 4933–44.
23. Parato KA, et al. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Mol Ther*. 2012; 20 (4): 749–58.
24. Byrd CM, et al. Construction of recombinant vaccinia virus: cloning into the thymidine kinase locus. *Methods Mol Biol*. 2004: 31–40.
25. Cotter CA, et al. Preparation of cell cultures and vaccinia virus stocks. *Curr Protoc Mol Biol*. 2017; 117 (1): 16.16.1–16.16.18.
26. Ramakrishnan MAJ. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016; 5 (2): 85.

27. Morgan DM. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol Biol.* 1998; 179–84.
28. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989; 24: 148–54.
29. Cottingham MG, Carroll MW. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. *Vaccine.* 2013; 31 (39): 4247–51.
30. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6 (10): 715–27.
31. Thorne SH. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. *Immunol Res.* 2011; 50: 286–93.
32. Matsuda T, et al. A comparative safety profile assessment of oncolytic virus therapy based on clinical trials. *Ther Innov Regul Sci.* 2018; 52 (4): 430–7.
33. Buller RML, et al. Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature.* 1985; 317 (6040): 813–5.
34. Schrörs B, et al. Multi-omics characterization of the 4T1 murine mammary gland tumor model. *Front Oncol.* 2020; 10: 1195.
35. Li Z, et al. Immunotherapeutic interventions of triple negative breast cancer. *J Transl Med.* 2018; 16 (1): 147.

## ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭМБРИОЛОГИЧЕСКОГО ЭТАПА ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПО МИКРОБНОМУ СОСТАВУ ЭЯКУЛЯТА

Е. А. Паначева<sup>2</sup>, Е. В. Кудрявцева<sup>1</sup>, Д. Л. Зорников<sup>1</sup>, Е. Э. Плотко<sup>2</sup>, В. М. Петров<sup>1</sup>, Е. С. Ворошилина<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, Екатеринбург, Россия

<sup>2</sup> Медицинский центр «Гармония», Екатеринбург, Россия

Один из ключевых факторов наступления беременности при использовании вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) — получение достаточного количества эмбрионов хорошего и отличного качества. Целью работы было разработать математическую модель для прогнозирования качества получаемых эмбрионов на основании результатов оценки микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ при нормозооспермии. Эякулят 127 мужчин использовали в процедуре экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). В зависимости от доли бластоцист хорошего и отличного качества, сформировавшихся на 5-й день культивирования (good-quality blastocyst development rate, GBDR), пациенты были разделены на две группы. В первую включены 57 пациентов с GBDR  $\geq$  40%, во вторую — 70 пациентов с GBDR < 40%. Всем пациентам в день оплодотворения проведено исследование параметров спермограммы по стандарту ВОЗ и определен состав микробиоты эякулята методом количественной ПЦР в реальном времени. С помощью дискриминантного анализа разработан способ прогнозирования эффективности эмбриологического этапа ВРТ у пар, планирующих процедуру ЭКО, при показателях эякулята, соответствующих критериям нормозооспермии, с расчетом прогностического индекса «Эмбрионы хорошего и отличного качества. Прогноз нормозооспермия» (ЭХО-Про-N). Если значение ЭХО-Про-N > 0,212, вероятность получения GBDR  $\geq$  40% низкая, если ЭХО-Про-N  $\leq$  0,212, вероятность высокая. Показатели чувствительности и специфичности составили соответственно 71,9% и 70,0%, эффективность способа — 70,9%. Разработанная прогностическая модель дает возможность прогнозирования получения GBDR  $\geq$  40% на основании комплексной оценки микробиоты эякулята.

**Ключевые слова:** микробиота эякулята, прогнозирование, эффективность ВРТ, ЭКО, ПЦР в реальном времени, дискриминантный анализ

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

**Вклад авторов:** Е. А. Паначева — организация исследования, отбор пациентов, выполнение ПЦР-РВ, анализ полученных данных, написание статьи; Е. В. Кудрявцева, Д. Л. Зорников — статистическая обработка, анализ полученных данных, написание статьи; Е. Э. Плотко, В. М. Петров — анализ полученных данных, написание статьи; Е. С. Ворошилина — организация исследования, выполнение ПЦР-РВ, анализ полученных данных, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 7 от 20 сентября 2019 г.). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие. Исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» от июня 1964 г.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Сергеевна Ворошилина  
ул. Тверитина, д. 16, г. Екатеринбург, 620100, Россия; voroshilina@gmail.com

**Статья получена:** 23.03.2023 **Статья принята к печати:** 14.04.2023 **Опубликована онлайн:** 26.04.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.015

## PREDICTING THE BLASTOCYST DEVELOPMENT RATE DURING ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES BASED ON SEMEN MICROBIOTA

Panacheva EA<sup>2</sup>, Kudryavtseva EV<sup>1</sup>, Zornikov DL<sup>1</sup>, Plotko EE<sup>2</sup>, Petrov VM<sup>1</sup>, Voroshilina ES<sup>1,2</sup>✉

<sup>1</sup> Ural State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation, Yekaterinburg, Russia

<sup>2</sup> Medical Center "Garmonia", Yekaterinburg, Russia

Obtaining enough good and excellent quality embryos is one of the key factors for achieving pregnancy using assisted reproductive technologies. This work was aimed at developing a mathematical model for predicting good and excellent quality embryos based on semen microbiota assessment in normozoospermia. The study included 127 men whose semen was used for in vitro fertilization (IVF). Patients were divided into 2 groups depending on the proportion of good-quality blastocyst developed on the 5<sup>th</sup> day of culturing (good-quality blastocyst development rate, GBDR). The 1<sup>st</sup> group included 57 patients with GBDR  $\geq$  40%, the 2<sup>nd</sup> group included 70 patients with GBDR < 40%. All patients' semen was assessed at the day of fertilization. Semen parameters were evaluated in accordance with the WHO standards and semen microbiota composition was determined by means of real-time PCR. Discriminant analysis was used for development of the prognostic model. We developed a method for predicting efficiency of the embryological IVF stage in normozoospermia: EGO-Pro-N prognostic index (Embryos of GOod and Excellent quality Prognosis in Normozoospermia). If the EGO-Pro-N value is greater than 0.212, the probability of receiving GBDR  $\geq$  40% is low. Conversely, if the EGO-Pro-N value is less than or equal to 0.212, the probability is high. Sensitivity and specificity of the method were 71.9% and 70.0% respectively, accuracy was 70.9%. The developed model allows us to predict good and excellent quality embryos based on comprehensive semen microbiota assessment in normozoospermia before IVF.

**Keywords:** semen microbiota composition, prognosis, ART effectiveness, IVF, real-time PCR, discriminant analysis

**Acknowledgments:** the authors would like to thank VN Khayutin, director of "Garmonia" Medical Center, for allowing them to conduct the study in the clinic's laboratory department.

**Author contribution:** Panacheva EA — organization of the study, data analysis, conducting PCR tests, article authoring, Kudryavtseva EV, Zornikov DL — statistical processing, data analysis, article authoring; Plotko EE, Petrov VM — data analysis, article authoring; Voroshilina ES — organization of the study, conducting PCR tests, data analysis, article authoring.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University, Federal State Budget Educational Institution of Higher Education under the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol № 7 of September 20, 2019). All patients signed the informed written consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina S. Voroshilina  
Tveritina, 16, Yekaterinburg, 620100, Russia; voroshilina@gmail.com

**Received:** 23.03.2023 **Accepted:** 14.04.2023 **Published online:** 26.04.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.015

Необходимость в применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) непрерывно растет, однако, по данным Национального регистра Российской Ассоциации репродукции человека (РАРЧ), эффективность программ ЭКО составляет не более 34,8% в расчете на перенос эмбрионов [1]. Одним из ключевых факторов наступления беременности при использовании ВРТ является получение достаточного количества эмбрионов хорошего и отличного качества [2]. Возможность прогнозировать количество получаемых эмбрионов хорошего качества позволит оптимизировать подготовку пациентов к проведению ВРТ и выбрать наиболее эффективный вариант ведения эмбриологического этапа. В настоящее время идет активный поиск маркеров качества эмбрионов на основании данных метаболомного, протеомного, транскриптомного статусов спермы, фолликулярной жидкости и эмбриологических сред, используемых для их культивирования [3]. При этом вопрос о влиянии микробиоты спермы на результаты ВРТ, в частности на качество получаемых эмбрионов, недостаточно изучен.

Процедура экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) происходит в нестерильных условиях [4]. Несмотря на тщательное соблюдение мер асептики, самое большее, чего удастся добиться, это снижение уровня микробного загрязнения в лабораториях ЭКО и в культуральных средах для эмбрионов. Используемые для получения эмбрионов гаметы (сперматозоиды и яйцеклетки) поступают из источников, в большинстве случаев содержащих бактерии [5]. По данным молекулярно-генетических исследований, микробный состав эякулята может быть представлен сложными полимикробными сообществами, образованными представителями разных родов и даже филумов бактерий, включающих анаэробные и факультативно-анаэробные бактерии, в том числе у пациентов без воспалительной патологии и с нормальными показателями спермограммы [6–8]. Установлена взаимосвязь между выявлением отдельных групп условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в эякуляте и снижением параметров спермограммы [9, 10].

В настоящее время в рамках подготовки мужчин к программам ВРТ требуется лишь исключить наличие в соскобе из уретры или эякуляте возбудителей инфекций, передающихся половым путем (ИППП) [11]. Присутствие же других микроорганизмов, которые могут быть причиной как стертых форм воспалительного процесса урогенитального тракта (УГТ) мужчин, так и неудач в протоколах ВРТ, не оценивают.

С проблемой бактериальной контаминации сред во время культивирования эмбрионов сталкиваются практически все лаборатории ЭКО [12, 13]. По данным литературы, частота бактериальной контаминации не превышает 1%, однако это событие может привести к получению эмбрионов плохого качества, гибели всех эмбрионов и, соответственно, прекращению лечебного цикла ВРТ.

Одним из основных источников бактериальной контаминации сред для культивирования эмбрионов считают микробиоту эякулята [12]. Несмотря на тщательную обработку в полученной порции эякулята остаются микроорганизмы, которые могут привести к контаминации питательной среды для эмбрионов. В случае классического ЭКО совместное культивирование обработанного эякулята и яйцеклеток проводят в течение 16–20 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С. Такие условия благоприятны для развития микроорганизмов, в первую очередь для облигатных анаэробов. Как следствие, среды могут содержать токсичные бактериальные метаболиты. Результатом негативного

воздействия бактериальных токсинов может стать фрагментация и гибель клеток эмбриона [13].

Влияние микробиоты эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ, на развитие эмбрионов следует оценивать более тщательно, чтобы разработать адекватные меры по предотвращению неудачных исходов эмбриологического этапа ВРТ.

Целью настоящего исследования была разработка математической модели для прогнозирования качества получаемых эмбрионов на основании результатов оценки микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения в программах ВРТ при нормозооспермии.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Дизайн исследования

Одноцентровое когортное ретроспективное исследование включало в себя оценку параметров спермограммы и микробного состава эякулята 127 мужчин, вступивших в программу ВРТ в Медицинском центре «Гармония» (г. Екатеринбург, Россия) с 2020 по 2021 г. Оценивали также параметры эмбриологического этапа ВРТ в данных программах: частоту оплодотворения, частоту образования blastocyst и частоту образования blastocyst отличного и хорошего качества, имеющих максимальный потенциал к имплантации.

### Критерии включения и исключения

Критерии включения: возраст пациентов 19–51 год; отсутствие приема пациентами гормональных, антибактериальных препаратов в течение последних трех месяцев; соответствие параметров спермограммы нормозооспермии; оплодотворение яйцеклеток методом классического ЭКО; согласие на участие в исследовании; возраст женщин 22–40 лет; отсутствие генетических заболеваний у пациентов и их родственников. В исследование были включены программы со свежими ооцитами с использованием классического ЭКО. Критерии исключения: использование для оплодотворения размороженных ооцитов; оплодотворение яйцеклеток методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ); клинические проявления инфекционно-воспалительных заболеваний УГТ; наличие ИППП; наличие у пациентов или их родственников генетических заболеваний; объем эякулята менее 2 мл; отказ пациентов от участия в исследовании.

### Эмбриологический этап ВРТ

Ооцит-кумулюсные комплексы помещали в среду Flushing (Origio; Дания). Для оплодотворения ооцитов использовали среду Sequential Fert (Origio; Дания). После оценки оплодотворения зиготы помещали в среду SAGE 1-Step (Origio; Дания), в которой эмбрионы культивировали до 5-го дня.

Для обработки образцов эякулята использовали метод осаждения в градиентах плотности SupraSperm (Origio; Дания), затем сперматозоиды дважды отмывали в буфере SpermPrep (Origio; Дания), после чего использовали метод «swim-up».

### Оценка морфологии эмбрионов

Качество развивающихся зигот и эмбрионов индивидуально оценивали под микроскопом приблизительно через 18, 72

и 96 ч после оплодотворения. Морфологическую оценку эмбрионов проводили на 5-е сутки развития от момента оплодотворения.

Эмбрионы отличного и хорошего качества на 5-й день культивирования имели следующие морфологические характеристики: в составе внутриклеточной массы достаточно много плотно упакованных клеток, трофэктодерма содержит много клеток, сформировавших плотный эпителий, бластоцель занимает более 80% объема эмбриона. Приемлемым уровнем эффективности эмбриологического этапа ВРТ считали получение не менее 40% бластоцист хорошего и отличного качества (good-quality blastocyst development rate (GBDR) от общего количества оплодотворенных яйцеклеток: GBDR  $\geq$  40% [14].

В зависимости от доли бластоцист хорошего и отличного качества, сформировавшихся на эмбриологическом этапе культивирования, пациенты были разделены на две группы: в первую включено 57 пациентов, у которых GBDR  $\geq$  40%, во вторую — 70 пациентов (GBDR < 40%).

### Методы исследования

Индукцию суперовуляции в обеих группах проводили по короткому протоколу с использованием антагонистов рекомбинантных и/или мочевых гонадотропинов в суточной дозе 150–300 МЕ. В качестве триггера овуляции применяли хорионический гонадотропин человека за 34–36 ч до пункции. Аспирацию фолликулов выполняли под внутривенным наркозом.

Подготовку мужчин и отбор образцов эякулята проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ по сбору эякулята для микробиологических исследований (пункт 2.2.4 Руководства ВОЗ) [15]. Обязательным условием было половое воздержание участника в течение 3–4 дней. Сбор эякулята пациенты осуществляли путем мастурбации в стерильный контейнер после предварительного мочеиспускания и тщательного туалета наружных половых органов, с использованием мыла и стерильных салфеток.

Клиническим материалом для исследования служил нативный эякулят. Анализ концентрации и подвижности сперматозоидов проводили с использованием анализатора Биола АФС-500 («Биола»; Россия). Морфологию сперматозоидов оценивали в окрашенных препаратах при увеличении микроскопа 1000 $\times$  с использованием иммерсионного объектива. Для подсчета пероксидазо-положительных лейкоцитов использовали тест LeucoScreen (FertiPro; Бельгия). Критериям нормозооспермии соответствовали пробы с объемом эякулята не менее 1,5 мл, концентрацией сперматозоидов не менее 15 млн/мл, общей подвижностью не менее 40% или прогрессивной подвижностью не менее 32%, нормальной морфологией сперматозоидов не менее 4%, количеством лейкоцитов не более 1 млн/мл, отсутствием повышенной вязкости. Определение микробного состава эякулята проводили с помощью количественной полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью тест-системы Андрофлор («ДНК-Технология»; Россия) в детектирующем амплификаторе «ДТпрайм» («ДНК-Технология»; Россия).

Материал для исследования (0,5 мл нативного эякулята) собирали в день оплодотворения яйцеклеток в пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл раствора буфера (ПРОБА ПК; «ДНК-Технология»; Россия). ДНК выделяли с

использованием комплекта реагентов ПРОБА-ГС («ДНК-Технология»; Россия). ПЦР-РВ проводили согласно инструкции производителя.

После реакции амплификации по показателю индикаторного цикла с помощью специального программного обеспечения проводили автоматический расчет количества ОБМ и количества каждой группы УГМ в представленном образце. Положительные сигналы по изучаемым микроорганизмам фиксировали не позднее 35-го цикла амплификации, что эквивалентно микробной нагрузке менее 10<sup>3</sup> геномэквивалент/мл (ГЭ/мл). Расчет доли отдельных видов и групп бактерий проводили относительно суммы всех выявленных в образце бактерий. Набор «Андрофлор» предназначен для определения ОБМ и 19 групп УГМ (*Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Haemophilus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa / Ralstonia spp. / Burkholderia spp.*, *Enterobacteriaceae / Enterococcus spp.*, *Gardnerella vaginalis (G. vaginalis)*, *Eubacterium spp.*, *Sneathia spp. / Leptotrichia spp. / Fusobacterium spp.*, *Megasphaera spp. / Veillonella spp. / Dialister spp.*, *Bacteroides spp. / Porphyromonas spp. / Prevotella spp.*, *Anaerococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Atopobium cluster (A. cluster)*, *Mycoplasma hominis (M. hominis)*, *Ureaplasma urealyticum (U. urealyticum)*, *Ureaplasma parvum (U. parvum)*, *Candida spp.*), присутствия облигатных патогенов (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* и *Trichomonas vaginalis*) и геномной ДНК человека (в качестве контроля взятия биологического материала).

### Методы статистического анализа

Статистическую обработку данных проводили с помощью R-версии 4.2.2 (сборка 2022-10-31) и StatPlus:mac 8.0.3 (AnalystSoft; США). Нормальность распределения признаков проверяли тестом Шапиро–Уилка. В качестве средних величин при описании переменных указывали медиану с процентилями 0,05 и 0,95. Достоверность различий между сравниваемыми количественными показателями оценивали с помощью *U*-теста Манна–Уитни, между частотными показателями — с помощью точного двустороннего теста Фишера. Все различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

Для формирования уравнения регрессии, которое легло в основу прогностической модели получения не менее 40% эмбрионов хорошего и отличного качества, использовали метод дискриминантного анализа с расчетом канонических коэффициентов дискриминантной функции (ККДФ). Для оценки эффективности предлагаемой прогностической модели был применен ROC-анализ. Оптимальный порог определяли по значению индекса Юдена.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Клинико-anamnestическая характеристика обследованных пациентов

Вначале было проведено сравнение групп по анамнестическим показателям. Группы не различались по возрасту мужчин (35,0 (28,8–43,2) против 34,0 (28,5–45,0) лет в группах 1 и 2 соответственно;  $p = 0,664$ ) и возрасту женщин (34,0 (26,0–40,0) против 34,0 (28,0–40,0) лет в группах 1 и 2 соответственно;  $p = 0,507$ ). По массо-ростовым показателям различия были не существенными ( $p > 0,05$ ). Учитывали данные соматического

Таблица 1. Частота выявления отдельных групп микроорганизмов в надпороговых значениях\*

Группы микроорганизмов	Частота выявления				Значимость $p$
	Группа 1 (n = 57)		Группа 2 (n = 70)		
	n	%	n	%	
<i>Lactobacillus spp.</i>	17	29,8	11	15,7	0,084
Грамположительные факультативные анаэробы	24	42,1	23	32,9	0,356
<i>Staphylococcus spp.</i>	6	10,5	3	4,3	0,297
<i>Streptococcus spp.</i>	7	12,3	13	18,6	0,463
<i>Corynebacterium spp.</i>	21	36,8	16	22,9	0,116
Грамотрицательные факультативные анаэробы	0	0	11	15,7	0,001
<i>Haemophilus spp.</i>	0	0	10	14,3	0,002
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Ralstonia spp.</i> / <i>Burkholderia spp.</i>	0	0	1	1,4	1
Облигатные анаэробы	35	61,4	41	58,6	0,856
<i>G.vaginalis</i>	8	14	17	24,3	0,181
<i>Megasphaera spp.</i> / <i>Veillonella spp.</i> / <i>Dialister spp.</i>	10	17,5	18	25,7	0,291
<i>Sneathia spp.</i> / <i>Leptotrichia spp.</i> / <i>Fusobacterium spp.</i>	4	7	5	7,1	1
<i>Bacteroides spp.</i> / <i>Porphyromonas spp.</i> / <i>Prevotella spp.</i>	14	24,6	24	34,3	0,25
<i>Peptostreptococcus spp.</i> / <i>Parvimonas spp.</i>	8	14	11	15,7	1
<i>Anaerococcus spp.</i>	17	29,8	14	20	0,219
<i>Eubacterium spp.</i>	30	52,6	29	41,4	0,217
<i>A.cluster</i>	4	7	7	10	0,753
<i>Enterobacteriaceae spp.</i> / <i>Enterococcus spp.</i>	8	14	6	8,6	0,398
Микоплазмы	10	17,5	11	15,7	0,814
<i>U. urealyticum</i>	2	3,5	4	5,7	0,69
<i>U. parvum</i>	7	12,3	7	10	0,779
<i>M. hominis</i>	2	3,5	2	2,9	1

Примечание: \* — для групп *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis* надпороговые значения  $> 0$ , для остальных групп микроорганизмов  $\geq 10^3$  ГЭ/мл.

анамнеза. Частота выявления соматической патологии (заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыводящей, дыхательной и нервной систем, эндокринопатий, патологии желудочно-кишечного тракта и аутоиммунных заболеваний) тоже не различалась между группами ( $p > 0,05$ ). Таким образом, группы оказались клинически сопоставимыми.

#### Данные эмбриологического этапа

Количество зрелых ооцитов MII составило 559 и 606 в группе 1 и группе 2 соответственно. При этом среднее количество ооцитов, полученных при пункции, у пациенток групп 1 и 2 не различалось (медианы составили 9 и 8,  $p = 0,250$ ). В результате оплодотворения методом ЭКО получено 458 зигот в группе 1 и 442 в группе 2, среднее количество полученных зигот не различалось между группами (медианы составили 6 и 5,5 для групп 1 и 2, соответственно;  $p = 0,207$ ). Для каждой пары рассчитывали долю оплодотворенных яйцеклеток, уровень бластуляции и показатель GBDR. По доле оплодотворенных яйцеклеток пациентки группы 1 и группы 2 не различались (медианы составили 85,7% и 80,0% соответственно;  $p = 0,471$ ), тогда как по уровню бластуляции и показателю GBDR были выявлены достоверные различия. Уровень бластуляции

составил 75,0% в группе 1 и 37,5% в группе 2 ( $p < 0,001$ ); показатель GBDR — 72,7% в группе 1 и 27,7% в группе 2 ( $p < 0,001$ ).

#### Анализ микробного состава эякулята

Бактериальная ДНК (ОБМ) отсутствовала или определялась в количестве менее  $10^3$  ГЭ/мл в 5 (8,8%) из 57 образцов группы 1 и 5 (7,1%) из 70 образцов группы 2 ( $p = 0,752$ ). В положительных образцах одновременно выявляли от 1 до 13 групп микроорганизмов в надпороговых значениях. Частота встречаемости отдельных групп бактерий в надпороговых значениях представлена в табл. 1.

В группе 1 значительно реже выявляли *Haemophilus spp.* и, как следствие, группу грамотрицательных факультативных анаэробов (ГОФА), к которой относятся данные бактерии. Частота выявления других групп УПМ достоверно не различалась между группами 1 и 2. Учитывая статистически значимые различия по частоте выявления *Haemophilus spp.* и ГОФА между группами 1 и 2, мы попытались оценить отличия по количеству данных групп микроорганизмов и их прогностическую эффективность в предсказании благоприятного исхода эмбриологического этапа ВРТ, однако получили неудовлетворительные результаты (табл. 2).



**Таблица 2.** Средние количества *Haemophilus spp.* и ГОФА в группах 1 и 2 и прогностическая эффективность данных показателей в предсказании благоприятного исхода эмбриологического этапа ВРТ

Группа микроорганизмов	Среднее количество, медиана, процентиля 0,05 и 0,95		p	Значение AUC (95%-й ДИ)
	Группа 1	Группа 2		
<i>Haemophilus spp.</i> , ГЭ/мл	0 (0-0)	0 (0-103,8)	0,003	0,571 (0,472-0,671)
ГОФА, ГЭ/мл	0 (0-0)	0 (0-103,8)	0,002	0,579 (0,479-0,678)

Ни один из отдельных параметров микробиоты эякулята не демонстрировал приемлемой прогностической эффективности в предсказании благоприятного исхода эмбриологического этапа ВРТ. В связи с многообразием сочетаний, в которых встречались отдельные группы УПМ, было решено применить для этих целей дискриминантный анализ с расчетом прогностического индекса, учитывающего все значимые параметры микробиоты эякулята.

### Дискриминантный анализ

Для прогнозирования GBDR  $\geq 40\%$  для пар, в которых параметры спермограммы у мужчины соответствовали критериям нормозоосперии, нами был разработан прогностический индекс ЭХО-Про-N («Эмбрионы хорошего и отличного качества. Прогноз нормозооспермия»).

Для разработки прогностического индекса в полученных матрицах клинико-лабораторных показателей провели дискриминантный анализ переменных в исследуемых группах.

Для определения вклада каждого отдельного микроорганизма в формирование вероятности получения GBDR  $\geq 40\%$  и разработки прогностического индекса проведено ранжирование признаков с помощью расчета ККДФ.

Индекс ЭХО-Про-N рассчитывали по формуле:

$$\text{ЭХО-Про-N} = 0,22 - X1 - 0,26 - X2 - 0,59 - X3 + 0,25 - X4 + 0,26 - X5 + 0,21 - X6 - 0,4 - X7 + 0,15 - X8 + 0,09 - X9 + 0,15 - X10 - 0,25 - X11 - 0,33 - X12 - 0,17 - X13 + 0,51 - X14 + 0,9 - X15 - 0,28 - X16 - 0,47, \text{ где}$$

X1 — общая бактериальная масса (ОБМ),

X2 — *Lactobacillus spp.*,

X3 — *Staphylococcus spp.*,

X4 — *G. vaginalis*,

X5 — *Megasphaera spp.* / *Veillonella spp.* / *Dialister spp.*,

X6 — *Sneathia spp.* / *Leptotrichia spp.* / *Fusobacterium spp.*,

X7 — *U. urealyticum*,

X8 — *U. parvum*,

X9 — *A. cluster*,

X10 — *Bacteroides spp.* / *Porphyromonas spp.* / *Prevotella spp.*,

X11 — *Anaerococcus spp.*,

X12 — *Peptostreptococcus spp.* / *Parvimonas spp.*,

X13 — *Eubacterium spp.*,

X14 — *Haemophilus spp.*,

X15 — *P. aeruginosa* / *Ralstonia spp.* / *Burkholderia spp.*,

X16 — *Enterobacteriaceae spp.* / *Enterococcus spp.*

Если значение ЭХО-Про-N  $> 0,212$ , можно прогнозировать, что вероятность GBDR  $\geq 40\%$  низкая, если ЭХО-Про-N  $\leq 0,212$  — высокая.

Среднее значение ЭХО-Про-N в группах 1 и 2 составило соответственно  $-0,470$  ( $-2,430$ ;  $-0,580$ ) и  $0,365$  ( $-0,933$ ;  $-2,260$ ). Различия статистически значимы ( $p < 0,001$ ). Графически значение индекса ЭХО-Про-N представлено на рис. 1.

ROC-кривая для индекса ЭХО-Про-N представлена на рис. 2. Площадь под кривой (area under the curve, AUC)

составляет  $0,777$  (95%-й ДИ:  $0,670-0,856$ ), что соответствует хорошему качеству модели прогнозирования.

Оптимальное значение порога для индекса ЭХО-Про-N составило  $0,212$ . Данный порог позволял прогнозировать получение GBDR  $\geq 40\%$  с чувствительностью  $71,9\%$  и специфичностью  $70,0\%$  при общей эффективности метода  $70,9\%$  (табл. 3).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее исследование были включены пары, участвовавшие в протоколах ВРТ, параметры спермограммы у которых соответствовали критериям нормозооспермии. Согласно действующим клиническим рекомендациям, наличие возбудителей ИППП было исключено у обоих супругов на этапе предгравидарной подготовки [11]. Такие образцы эякулята рассматривают как идеально подходящие для проведения ЭКО, и в рутинной клинической практике расширенное исследование микробного состава эякулята не проводят. Наше исследование показало, что большинство использованных образцов эякулята содержали бактериальную ДНК в количестве не менее  $10^3$  ГЭ/мл. В положительных образцах одновременно идентифицировали до 13 групп микроорганизмов в различных сочетаниях. Наличие бактерий в эякуляте было показано ранее в многочисленных исследованиях, наши наблюдения в очередной раз подтверждают этот факт [4, 6, 8, 10, 16].

Нас интересовал микробный состав эякулята с точки зрения его потенциально негативного влияния на исход эмбриологического этапа ВРТ. В ходе исследования мы установили, что микробный состав образцов эякулята, с использованием которых доля blastocyst хорошего качества на 5-е сутки была приемлемой (GBDR  $\geq 40\%$ ), отличался от состава тех образцов, использование которых не позволяло получить достаточное количество эмбрионов. Для последней группы было характерно присутствие грамотрицательных факультативных анаэробов (преимущественно *Haemophilus spp.*). В то же время в образцах эякулята, с использованием которых эффективность эмбриологического этапа была удовлетворительной, отмечена тенденция к более частому обнаружению *Lactobacillus spp.* и *Corynebacterium spp.*, но без статистической значимости. Именно это наблюдение привело нас к попытке смоделировать прогностическую модель на основе показателей микробиоты эякулята, которую можно было бы использовать для оценки его качества еще на этапе предгравидарной подготовки.

Попытки предсказать эффективность эмбриологического этапа ВРТ проводились неоднократно с использованием данных протеомного, транскриптомного и метаболомного анализа спермы, фолликулярной жидкости и культуральных сред [2, 3]. По некоторым данным, 93 вида белков спермы могут быть функционально связаны с формированием зиготы и следующими стадиями развития эмбриона на эмбриологическом этапе ВРТ [17]. Выявлены потенциальные белковые маркеры в сперме, которые могли

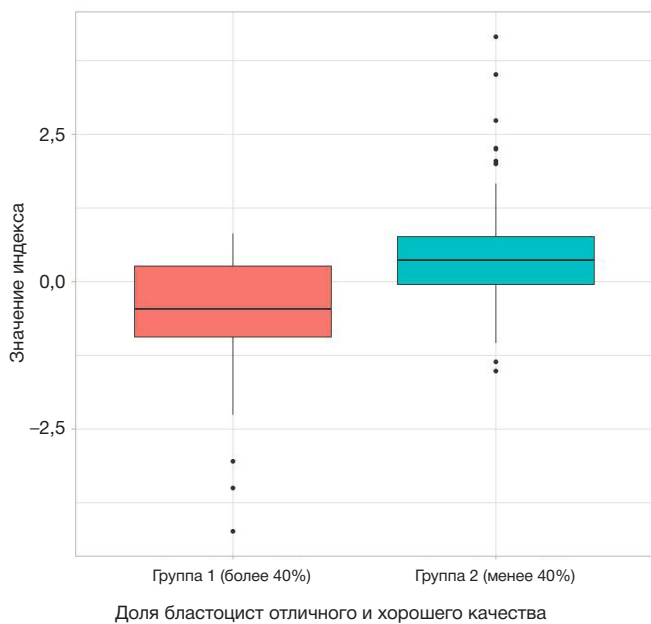


Рис. 1. Значения индекса ЭХО-Про-N в группах 1 и 2

бы предсказать исход ВРТ *in vitro* у пар с идиопатическим бесплодием [16]. Присутствие *Alphaproteobacteria* в сперме у пациентов с нормозооспермией снижало вероятность получения эмбрионов отличного и хорошего качества [4]. Однако данные наблюдения не привели к созданию реально работающих прогностических моделей.

Разработанная нами математическая модель с расчетом прогностического индекса ЭХО-Про-N может быть использована на этапе предгравидарной подготовки пар к процедуре ВРТ, особенно в тех случаях, когда ожидаемое число яйцеклеток будет невелико, и каждый эмбрион хорошего и отличного качества бесценен.

Важно уточнить, что бактериальная контаминация культуральных сред с эмбрионами была зарегистрирована только в случаях оплодотворения яйцеклеток методом классического ЭКО. В программах с использованием ИКСИ, когда с помощью микроинструментов в яйцеклетку вводится один сперматозоид, такие случаи не зарегистрированы [18]. Вероятно, это связано с тем, что в

Таблица 3. Чувствительность и специфичность индекса ЭХО-Про-N (классификационная матрица)

Группа/ Прогноз	1	2	Всего	Количество правильных, %
1	41	16	57	71,9
2	21	49	70	70
Всего	62	65	127	70,9

## Литература

1. Корсак В. С., Смирнова А. А., Шурыгина О. В. Регистр ВРТ Общероссийской общественной организации «Российская ассоциация репродукции человека». Отчет за 2020 год. Проблемы репродукции. 2022; 28 (6): 12–27.
2. Ильина А. А., Калинина И. И., Трошина Т. Г., Ильин К. А., Болтовская М. Н., Степанова И. И., и др. Фолликулярная жидкость как среда, определяющая качество ооцита и исход программ ВРТ (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2008; 14 (4): 27–39.
3. Валиахметова Э. З., Кулакова Е. В., Скибина Ю. С., Грязнов А. Ю., Сысоева А. П., Макарова Н. П. и др. Неинвазивное тестирование преимплантационных эмбрионов человека *in vitro* как способ прогнозирования исходов программ экстракорпорального оплодотворения. Акушерство и гинекология. 2021; 5: 5–16.
4. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Parm Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human *in vitro* fertilization procedure. Reproductive Biology and Endocrinology. 2020; 18: 1–13.
5. Franasiak JM, Scott Jr RT. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. Fertility and sterility. 2015; 104 (6): 1364–71.

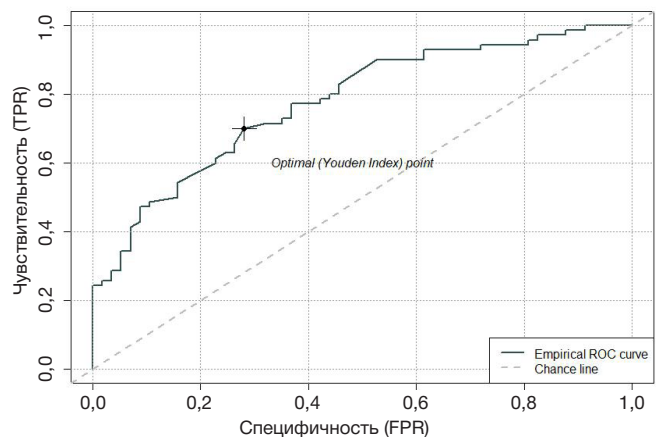


Рис. 2. ROC-кривая для индекса ЭХО-Про-N

случае ИКСИ в культуральную среду привносится меньшее количество жизнеспособных бактерий. Таким образом, с целью увеличения эффективности программы ЭКО в случае получения негативного прогноза на получение достаточного количества эмбрионов хорошего качества может быть рекомендовано проведение ИКСИ.

## Выводы

Разработанная нами прогностическая модель дает возможность прогнозирования качества получения эмбрионов на основании комплексной оценки микробного состава эякулята, используемого для оплодотворения методом ЭКО. Оценка микробного состава эякулята у мужчин, планирующих проведение ВРТ, возможна еще на этапе предгравидарной подготовки, в том числе в тех случаях, когда параметры спермограммы соответствуют критериям нормозооспермии. Использование предлагаемого прогностического индекса ЭХО-Про-N обосновывает разработку индивидуального плана лечения для пациентов ВРТ, нацеленного на получение оптимального количества высококачественных эмбрионов. Предлагаемый метод прогноза можно широко использовать в клинической практике, он не требует значительных материальных затрат и организационных усилий.

6. Ворошилина Е. С., Зорников Д. Л., Иванов А. В., Почерников Д. Г., Паначева Е. А. Микробиота эякулята: кластерный анализ результатов, полученных при исследовании методом ПЦР-РВ. Вестник Российского государственного медицинского университета. 2020; (5): 66–73.
7. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring, Wang SL, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertility and sterility*. 2013; 100 (5): 1261–9.
8. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS one*. 2014; 9 (10): e110152.
9. Pagliuca C, Cariati F, Bagnulo F, Scaglione E, Carotenuto C, Farina F et al. Microbiological evaluation and sperm DNA fragmentation in semen samples of patients undergoing fertility investigation. *Genes*. 2021; 12 (5): 654.
10. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10: 234.
11. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 31 июля 2020 г. N 803н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».
12. Lin LL, Guu HF, Yi YC, Kung HF, Chang JC, Chen YF, et al. Contamination of ART culture Media—The role of semen and strategies for prevention. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2021; 60 (3): 523–5.
13. Li R, Du F, Ou S, Ouyang N, Wang W. A new method to rescue embryos contaminated by bacteria. *F&S Reports*. 2022; 3 (2): 168–71.
14. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017; 35 (5): 494–510.
15. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека, пятое издание. Москва, 2012.
16. Jodar M, Attardo-Parrinello C, Soler-Ventura A et al. Sperm proteomic changes associated with early embryo quality after ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2020; 40 (5): 700–10.
17. Castillo J, Jodar M, Oliva R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*. 2018; 24 (5): 535–55.
18. Peter MM Kastrop, Lia AM de Graaf-Miltenburg, Dagmar R Gutknecht, Sjerp M Weima. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Human Reproduction*. 2007; 22 (8): 2243–48.

## References

1. Korsak VS, Smirnova AA, Shurygina OV. Registr VRT Obshherossijskoj obshhestvennoj organizacii «Rossijskaya associaciya reprodukcii cheloveka». Otchet za 2020 god. *Problemy reprodukcii*. 2022; 28 (6): 12–27. Russian.
2. Ilna AA, Kalinina II, Troshina TG, Ilin KA, Boltovskaya MN, Stepanova II, i dr. Follikulyarnaya zhidkost' kak sreda, opredelyayushhaya kachestvo oocita i ishod programm VRT (obzor literatury). *Problemy reprodukcii*. 2008; 14 (4): 27–39. Russian.
3. Valiaxmetova EhZ, Kulakova EV, Skibina YuS, Gryaznov AYU, Syssoeva AP, Makarova NP, i dr. Neinvazivnoe testirovanie preimplantacionnyx ehmbriionov cheloveka in vitro kak sposob prognozirovaniya ishodov programm. *Russian. ehkstrakorporal'nogo oplodotvoreniya. Akusherstvo i ginekologiya*. 2021; 5: 5–16.
4. Štšepetova J, Baranova J, Simm J, Pam Ü, Rööp T, Sokmann S, et al. The complex microbiome from native semen to embryo culture environment in human in vitro fertilization procedure. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020; 18: 1–13.
5. Frasiak JM, Scott Jr RT. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertility and sterility*. 2015; 104 (6): 1364–71.
6. Voroshilina ES, Zornikov DL, Ivanov AV, Pochernnikov DG, Panacheva EA. Semen microbiota: cluster analysis of real-time PCR data. *Bulletin of RSMU*. 2020; (5): 62–9. DOI: 10.24075/brsmu.2020.064.
7. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring, Wang SL, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertility and sterility*. 2013; 100 (5): 1261–9.
8. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS one*. 2014; 9 (10): e110152.
9. Pagliuca C, Cariati F, Bagnulo F, Scaglione E, Carotenuto C, Farina F et al. Microbiological evaluation and sperm DNA fragmentation in semen samples of patients undergoing fertility investigation. *Genes*. 2021; 12 (5): 654.
10. Baud D, Pattaroni C, Vulliamoz N, Castella V, Marsland BJ, Stojanov M. Sperm microbiota and its impact on semen parameters. *Frontiers in microbiology*. 2019; 10: 234.
11. Prikaz Ministerstva zdravooxraneniya RF ot 31 iyulya 2020 g. N 803n «O poryadke ispol'zovaniya vspomogatel'nyx reproductivnyx tehnologij, protivopokazaniyax i ogranicheniyax k ix primeneniyu». Russian.
12. Lin LL, Guu HF, Yi YC, Kung HF, Chang JC, Chen YF, et al. Contamination of ART culture Media—The role of semen and strategies for prevention. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2021; 60 (3): 523–5.
13. Li R, Du F, Ou S, Ouyang N, Wang W. A new method to rescue embryos contaminated by bacteria. *F&S Reports*. 2022; 3 (2): 168–71.
14. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017; 35 (5): 494–510.
15. WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen, 5th ed.; WHO Press, World Health Organization: Geneva, Switzerland. 2010.
16. Jodar M, Attardo-Parrinello C, Soler-Ventura A et al. Sperm proteomic changes associated with early embryo quality after ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2020; 40 (5): 700–10.
17. Castillo J, Jodar M, Oliva R. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*. 2018; 24 (5): 535–55.
18. Peter MM Kastrop, Lia AM de Graaf-Miltenburg, Dagmar R Gutknecht, Sjerp M Weima. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management. *Human Reproduction*. 2007; 22 (8): 2243–48.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *AEROCOCCUS* SP. 1KP-2016, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ПАЦИЕНТА С ИНФЕКЦИЕЙ КРОВОТОКА

А. В. Чаплин<sup>1,2</sup>✉, И. А. Чагина<sup>1</sup>, А. С. Пименова<sup>1</sup>, Н. Т. Гадуа<sup>1</sup>, Н. М. Каргальцева<sup>1</sup>, О. Ю. Борисова<sup>1,2</sup>, Е. Е. Донских<sup>2</sup>, Л. И. Кафарская<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г. Н. Габричевского, Москва, Россия

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

Бактерии рода *Aerococcus* часто ассоциированы с инфекциями мочевыводящих путей и кровотока у человека. Штамм *Aerococcus* sp. 1KP-2016, выделенный из лейкоцитарного слоя крови, обладал последовательностью 16S рРНК, совпадающей на 98,7% и менее с ранее описанными представителями данного рода. Целью работы было провести полногеномное секвенирование *Aerococcus* 1KP-2016 с последующей филогенетической реконструкцией. Показано, что *Aerococcus* 1KP-2016 является представителем нового вида рода *Aerococcus*, наиболее близкого к *Aerococcus viridans* и *Aerococcus urinaeequi*. Геномная последовательность, имеющая длину 2,042 млн п.н. и GC-состав 38,5%, депонирована в DBJ/EMBL/GenBank под идентификатором NEEY00000000.

**Ключевые слова:** *Aerococcus*, инфекция кровотока, лейкоцитарный слой крови, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ

**Вклад авторов:** А. В. Чаплин — филогенетический анализ, анализ данных, подготовка рукописи; И. А. Чагина, А. С. Пименова, Н. Т. Гадуа — микробиологические исследования, подготовка рукописи; Н. М. Каргальцева, Л. И. Кафарская — анализ литературы, подготовка рукописи; О. Ю. Борисова — молекулярно-генетические исследования, анализ данных, анализ литературы, подготовка рукописи; Е. Е. Донских — анализ данных, анализ литературы, подготовка рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора (протокол № 28 от 18 ноября 2014 г.); от пациента получено добровольное письменное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Андрей Викторович Чаплин  
ул. Адмирала Макарова, д. 10, г. Москва, 125212, Россия; okolomedik@gmail.com

**Статья получена:** 22.03.2023 **Статья принята к печати:** 16.04.2023 **Опубликована онлайн:** 25.04.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.012

## GENETIC CHARACTERIZATION OF *AEROCOCCUS* SP. 1KP-2016 STRAIN ISOLATED FROM A PATIENT WITH BLOODSTREAM INFECTION

Chaplin AV<sup>1,2</sup>✉, Chagina IA<sup>1</sup>, Pimenova AS<sup>1</sup>, Gadua NT<sup>1</sup>, Kargaltseva NM<sup>1</sup>, Borisova OYu<sup>1,2</sup>, Donskikh EE<sup>2</sup>, Kafarskaya LI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

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

*Aerococcus* genus bacteria are often associated with human urinary tract and bloodstream infections. The *Aerococcus* sp. 1KP-2016 strain isolated from the buffy coat had the 16S rRNA sequence that was a 98.7% (and less) match with the previously described members of this genus. The purpose of this study was to perform whole genome sequencing of *Aerococcus* 1KP-2016 followed by phylogenetic reconstruction. We have shown that *Aerococcus* 1KP-2016 belongs to the new species of the *Aerococcus* genus that is closest to *Aerococcus viridans* and *Aerococcus urinaeequi*. The genomic sequence, which consists of 2.042 million bps with GC content at 38.5%, was deposited in the DBJ/EMBL/GenBank under identifier NEEY00000000.

**Keywords:** *Aerococcus*, bloodstream infection, buffy coat (blood leukocyte layer), whole genome sequencing, phylogenetic analysis

**Author contribution:** AV Chaplin — phylogenetic analysis, data analysis, manuscript authoring; IA Chagina, AS Pimenova, NT Gadua — microbiological studies, manuscript authoring; NM Kargaltseva, LI Kafarskaya — literature analysis, manuscript authoring; OYu Borisova — molecular genetic studies, data analysis, literature analysis, manuscript authoring; EE Donskikh — data analysis, literature analysis, manuscript authoring.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology (Minutes #28 of November 18, 2014); the patient signed a voluntary consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Andrey Viktorovich Chaplin  
10 Admiral Makarov str., Moscow, 125212, Russia; okolomedik@gmail.co

**Received:** 22.03.2023 **Accepted:** 16.04.2023 **Published online:** 25.04.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.012

Род *Aerococcus* был впервые описан в 1953 г., первым его изученным представителем стал *Aerococcus viridans*, выделяемый из воздуха и уличной пыли [1]. В настоящее время известно восемь видов, входящих в род *Aerococcus*: *A. viridans*, *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. urinaehominis*, *A. urinaeequi*, *A. suis*, *A. vaginalis* [2].

Представители рода *Aerococcus* чаще связаны с инфекцией мочевыводящих путей и уросепсисом [3]. Вместе с тем, в последнее десятилетие появилось много сообщений о случаях осложнений, вызываемых бактериями этого рода, в виде инфекции кровотока и инфекционного эндокардита, при которых *A. urinae* и *A. sanguinicola* считают наиболее частой этиологической причиной [2, 3]. Кроме того, было показано, что аэрококки этого рода способны вызывать инвазивные

инфекции — остеомиелит, менингит, септический артрит, перитонит, инфекции мягких тканей, этиологию которых чаще связывают с выделением *Aerococcus*-подобных микроорганизмов и *A. urinae* [2]. В Дании с 1987 г. описано 17 случаев бактериемии/септицемии, вызванных *Aerococcus*-подобными микроорганизмами с выделением в чистой культуре из крови, из которых в шести случаях был эндокардит, и у остальных больных — септицемия, несмотря на адекватную антимикробную терапию у семи пациентов произошел летальный исход [4]. По данным других авторов, выделение *Aerococcus* в гемокультуре расценивали как этиологический фактор бактериемии при заболеваниях мочевыделительной системы [5].

Вирулентность видов *Aerococcus* связывают со способностью этих микроорганизмов к образованию

биофленок (в том числе *in vivo* на клапанах сердца), агрегации тромбоцитов, бактериальной адгезии с помощью капсульного полисахарида, наличие которого было подтверждено сравнительным геномным анализом, показавшим широкое внутривидовое разнообразие локусов, ответственных за его синтез у представителей этого рода [2, 6, 7].

Целью работы было представить характеристику штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016, выделенного из крови пациента с инфекцией кровотока.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016 проводили на Columbia Agar Base (Conda; Испания) с добавлением 10% бараньей крови в течение 24–48 ч при температуре  $37 \pm 1$  °C в микроаэрофильных условиях. Культурально-морфологические свойства выросших колоний оценивали с помощью стереоскопического микроскопа SteREO Discovery V12 (Carl Zeiss; Германия) (объектив PlanApo S 1,0 — FWD 60 мм; окуляр Pl 10 x 23 Br foc). Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму (ЗАО «ЭКОлаб»; Россия). Окрашенные мазки просматривали с помощью светового микроскопа Axio Scope A1 (объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр Pl 10 x 23 Br foc (Carl Zeiss; Германия)). Биохимические свойства бактерий были изучены с помощью коммерческой биохимической тест-системы Микро-ЛА-Тест СТРЕПТОтест 16 (Лаксма; Чехия) и лабораторно приготовленного теста на каталазу.

Антибиотикочувствительность изучали с помощью диско-диффузионного метода в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) с использованием коммерческих стандартизованных бумажных дисков (HiMedia Laboratories Pvt. Limited; Индия).

Разрушение клеток для высвобождения хромосомной ДНК производили путем кипячения. Амплификацию фрагмента гена 16S рПНК осуществляли согласно общепринятому протоколу [8]. Реакционная смесь для ПЦР содержала 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 0,1 мкМ праймеров — 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGYTACCTGTTCAGACTT-3'), 200 мМ каждого нуклеозидтрифосфата и 1 ед. Taq ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific; Литва). Амплификацию проводили с 1 мкл препарата ДНК в общем объеме реакционной смеси 25 мкл с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология»; Россия). Очистку ПЦР-продуктов и их секвенирование проводили на базе ЗАО «Евроген» (Москва, Россия) (<http://evrogen.ru/>). Результаты секвенирования обрабатывали с помощью программного обеспечения ChromasLite (Technelysium Pty Ltd, Австралия) (для формата хроматограммы), секвенированные последовательности сопоставляли с международной онлайн-базой данных EMBL/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) с помощью алгоритма megablast.

Секвенирование генома штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016 было выполнено на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора с помощью системы Ion Proton (Thermo Fisher Scientific; США). Сборка генома *de novo* была сделана с помощью программного обеспечения SPAdes [9]. Проверка на контаминацию сборки проведена с помощью Contest16S [10] и CheckM [11]. Для поиска систем CRISPR-Cas использовали CRISPRCasFinder [12], интегрированных фаговых геномов — PHASTER [13], генов антибиотикорезистентности — ResFinder [14].

Для сравнительного анализа были использованы все публично доступные геномы рода *Aerococcus* из базы данных Refseq на момент 4 октября 2021 г., а также *Abiotrophia defectiva* ATCC 49176T в качестве внешнего представителя (outgroup). Белок-кодирующие области в геномах, в соответствии с представленными в базах данных аннотациями, были кластеризованы в группы ортологов с использованием программного обеспечения ProteinOrtho [15] со стандартными настройками. В результате была получена консервативная часть протеома из 543 групп ортологов, включающих в себя по одному однокопийному белок-кодирующему гену из каждого генома. Аминокислотные последовательности белков в данных группах ортологов были выровнены с помощью MUSCLE [16] и конкатенатированы. Филогенетическая реконструкция на основании полученного конкатената выполнена с помощью алгоритма RapidNJ [17]. Среднюю нуклеотидную идентичность между геномами рассчитывали с помощью подхода ANIb и онлайн-сервиса JSpeciesWS [18]. Данные по средней нуклеотидной идентичности представлены двумя значениями через черту, чтобы отобразить различия между картированием фрагментов первого генома на второй и второго на первый соответственно. База данных GTDB, содержащая в себе альтернативную таксономию на основании исключительно филогеномного подхода [19], на момент написания статьи была представлена релизом 202.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штамм *Aerococcus* sp. 1KP-2016 был выделен из лейкоцитарного слоя крови пациента с инфекцией

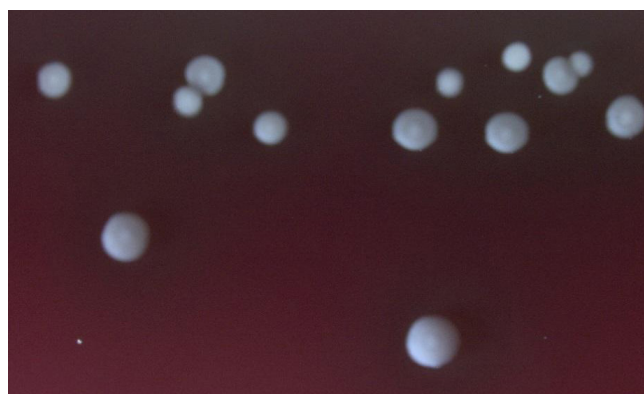


Рис. 1. Колонии *Aerococcus* sp. 1KP-2016 на колумбийском агаре (стереомикроскоп Stereo Discovery V12 (Carl Zeiss; Германия))

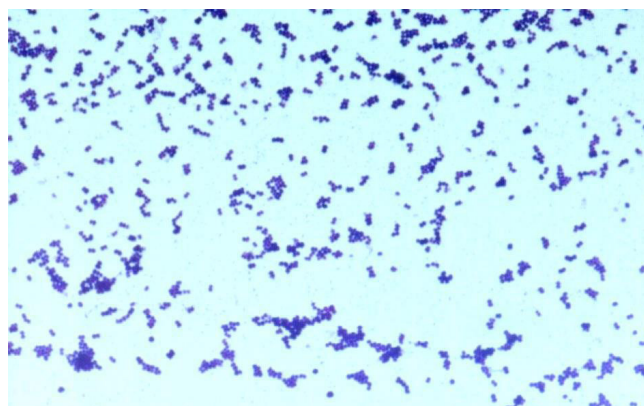


Рис. 2. Микрофотография мазка *Aerococcus* sp. 1KP-2016, окрашенного по Граму (световой микроскоп Axio Scope A1, объектив EC Plan-NEOFLUAR 100 x 1,3; окуляр Pl 10 x 23 Br foc (Carl Zeiss; Германия))

кровотока (36 лет, г. Ставрополь) в августе 2016 г., у которого на протяжении длительного времени (в течение года) отмечалась субфебрильная температура.

На колумбийском агаре через 24–48 ч формировались единичные мелкие гладкие колонии размером менее 1 мм с неровными краями, приподнятым центром, полупрозрачные серовато-белого цвета с небольшой зоной гемолиза (рис. 1). В мазке, окрашенном по Граму, были выявлены грамположительные кокки, образующие тетрады (рис. 2). При оценке биохимических свойств выделенная культура дала положительные результаты на галактозидазу, эскулин, лактозу, трегалозу, и отрицательные на каталазу, гиппурат, фосфатазу, лейцин, альфа-аргинин, уреазу, маннитол, сорбитол, раффинозу, инулин, мелибиозу, рибозу. Культура была резистентна к ципрофлоксацину, офлоксацину, пенициллину, эритромицину, доксициклину, сохраняла промежуточную резистентность к клиндамицину и чувствительность только к имипенему.

Геном штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016, собранный до уровня контигов, был депонирован в DBJ/EMBL/GenBank под идентификатором NEEY00000000, впоследствии он вошел в NCBI Refseq как NZ\_NEEY00000000. В результате сборки получено 119 контигов со средним покрытием 78х, суммарная длина полученной геномной последовательности составила 2,042 млн п.н. GC-состав достигал 38,5%. Алгоритм Contest16S не выявил различающихся фрагментов гена 16S рПНК, свидетельствующих о контаминации. Анализ набора консервативных генов с помощью CheckM показал оценку полноты генома 98,9% и оценку контаминации 1,1%, что соответствует высокому качеству сборки. В геноме не обнаружено локусов CRISPR. По данным PHASTER, геном имеет два предполагаемых профага в своем составе, в одном из которых присутствуют неповрежденные гены главного капсидного белка (B9P78\_00230), белка хвоста (B9P78\_00200) фаговой терминазы (B9P78\_00240) и праймазы (B9P78\_00325), что указывает на его интактность. Несмотря на низкую чувствительность штамма к антибактериальным препаратам, в результате поиска генов резистентности к антибиотикам был обнаружен только ген, кодирующий хлорамфеникол-О-ацетилтрансферазу (B9P78\_09255). Регион в начале контига NEEY01000023 кодирует ряд ферментов биосинтеза полисахаридов (B9P78\_05530-B9P78\_05565), входящих в состав клеточной стенки или капсулы.

Последовательность 16S рПНК штамма *Aerococcus* sp. 1KP-2016 была на 98,7% и 98,6% идентична последовательностям типовых штаммов *A. viridans* и *A. urinaeequi* соответственно. В настоящий момент для дифференциации бактериальных видов принят порог в 98,7% [20] и, таким образом, схожесть 16S рПНК в данном случае не позволяет однозначно судить о таксономическом положении. В то же время средняя нуклеотидная идентичность между просеквенированной геномной последовательностью и геномами типовых штаммов *A. viridans* ATCC 11563 и *A. urinaeequi* DSM 20341 составит 77,38/77,39% и 76,49/76,26% соответственно. Это значительно ниже, чем общепринятый порог в 95–96% для отнесения бактерий к одному виду [20, 21], что говорит о необходимости введения нового вида. Полученный результат дополнительно подтверждается базой данных альтернативной, построенной на сравнении геномов таксономии GTDB, в которой штамм 1KP-2016 отнесен к отдельному виду *Aerococcus* sp002252085.

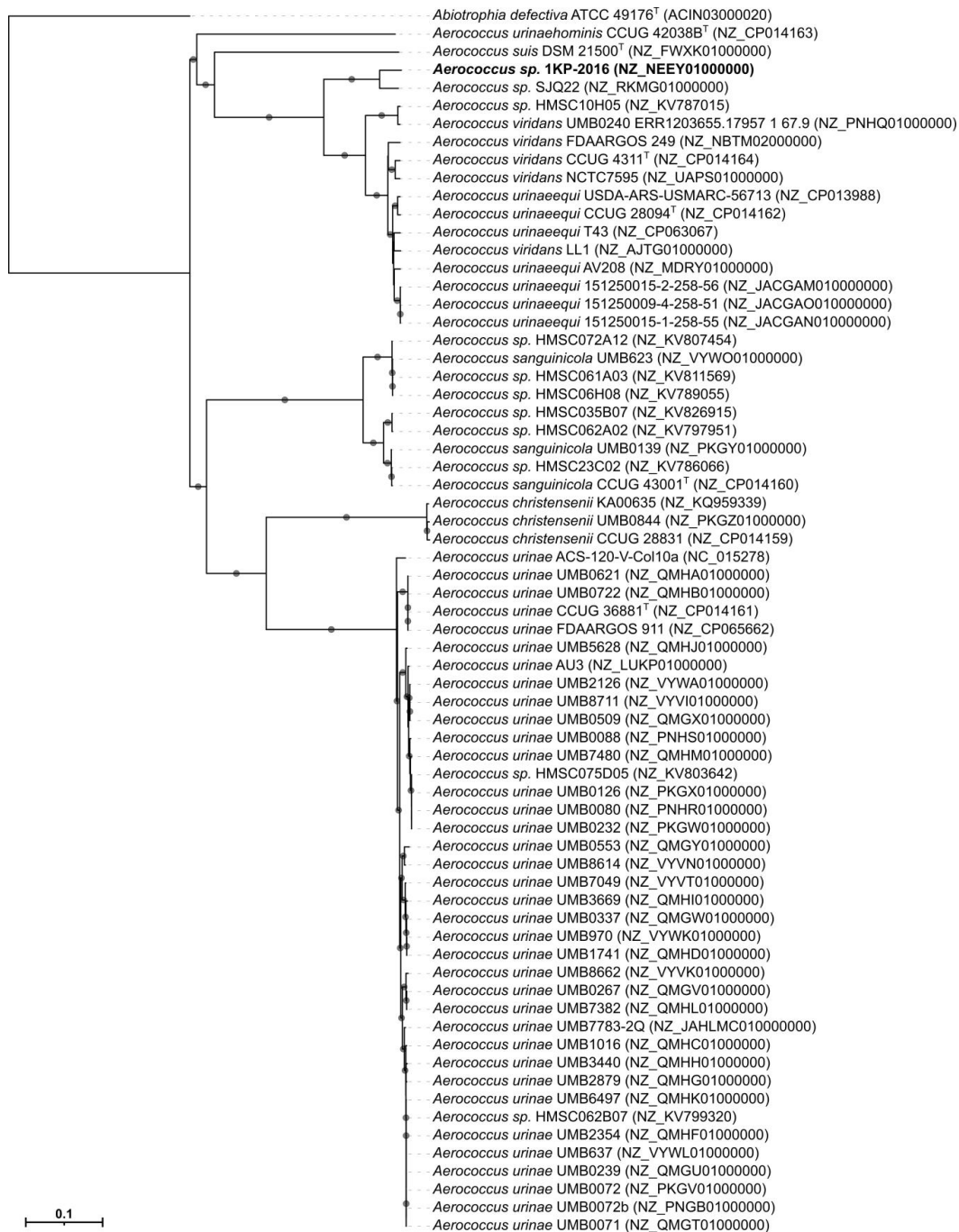
На основании реконструкции филогении (рис. 3) показано, что наиболее родственным к штамму *Aerococcus* sp. 1KP-2016 является штамм *Aerococcus* sp. SJQ22 (RKM01000000), выделенный из почвы и на данный момент не отнесенный ни к одному валидированному виду рода *Aerococcus*. Однако средняя нуклеотидная идентичность между *Aerococcus* sp. 1KP-2016 и этим штаммом составила всего лишь 87,87/88,05%, что опять же ниже общепринятого уровня сходства внутри вида.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

*Aerococcus* являются причиной спорадических заболеваний мочевого тракта, эндокардита, инфекций ликвора и кровотока. Наиболее часто выделяют *A. urinae* (55–60%), *A. sanguinicola* (26–46%) и реже — *A. viridians*. В Европе и США превалирует *A. sanguinicola* и редко — *A. viridians*. *Aerococcus* рассматривают как часть нормальной микрофлоры урогенитального тракта и выделяют из мочи при отсутствии клинических симптомов заболевания. Ретроспективное когортное исследование 2010–2015 гг. показало этиологическую роль *Aerococcus* при инфекциях мочевыводящих путей и бессимптомной бактериурии, преимущественно у пожилых женщин, при этом в 35% случаев помимо аэрококков были выделены другие микроорганизмы [5, 22]. Ретроспективное когортное исследование 2005–2020 гг. больных с положительной гемокультурой аэрококков показало в 22,4% случаев достоверную клиническую картину наличия инфекции кровотока, где летальность зависела от продолжительности заболевания: при 30-дневной она составляла 17% и при трехмесячной — 24% случаев [2]. При выделении из пробы мочи или крови микробиологам трудно идентифицировать *Aerococcus*, так как по морфологии эти бактерии часто принимают за стафилококки, по гемолизу — за α-гемолитические стрептококки. Учитывая низкую биохимическую активность, биохимические тесты не позволяют получить достоверные результаты. В связи с этим видовая идентификация до вида возможна с использованием масс-спектрометрии, однако данная технология позволяет идентифицировать пять видов аэрококков: *A. christensenii*, *A. sanguinicola*, *A. urinae*, *A. urinaehominis*, *A. viridians*. Поэтому для идентификации штаммов аэрококков, выделенных из крови, применяют секвенирование гена 16S рПНК [5, 22].

Проведенное исследование позволило впервые идентифицировать штамм *Aerococcus* sp. 1KP-2016, который выделен из лейкоцитарного слоя крови человека, обладает последовательностью 16S рПНК, совпадающей на 98,7% и менее с ранее описанными представителями данного рода. Проведенное полногеномное секвенирование с последующей филогенетической реконструкцией показало, что данный штамм является представителем нового вида рода *Aerococcus*, наиболее близкого к *A. viridans* и *A. urinaeequi*.

Следовательно, представители *Aerococcus* остаются микроорганизмами, у которых эпидемиологические и клинические характеристики полностью не изучены. Имеется много фундаментальных вопросов о патогенетической роли аэрококков в инфекционной инвазивной патологии. Сложности видовой идентификации внутри рода *Aerococcus* требуют применения современных молекулярно-генетических технологий, что позволяет определять новые виды микроорганизмов и расширять



**Рис. 3.** Филогенетическое древо, реконструированное по последовательностям 543 консервативных однокопийных белков. Штамм, описанный в данной работе, выделен полужирным. Типовые штаммы отмечены верхним индексом «Т». Видовые названия указаны в соответствии с названиями в базе данных Refseq. Клады с уровнем bootstrap > 90 отмечены кругами

этиологический спектр возбудителей тяжелых инвазивных заболеваний.

## Выводы

Генотипические особенности изученного штамма позволяют сделать вывод, что выделенный из крови

штамм 1KP-2016 является представителем нового вида рода *Aerococcus*, который эволюционно близок *A. viridans* и *A. urinaeequi*, но в то же время отличается от них. Необходимо дальнейшее изучение его фенотипических и хемотаксономических свойств в рамках полифазного подхода к бактериальной систематике.

## Литература

- Williams RE, Hirsch A, Cowan ST. *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J Gen Microbiol*. 1953; 8: 475–80.
- Tai DBG, Go JR, Fida M, Saleh JA. Management and treatment of *Aerococcus* bacteremia and endocarditis. *International J Infect Dis*. 2021; 102: 584–9.
- Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22: 22–7.
- Christensen JJ, Jensen IP, Faerk J, Kristensen B, Skov R, Korer B. The Danish ALO Study Group. Bacteremia / Septicemia Due to *Aerococcus*-Like Organisms: Report of Seventeen Cases. *Clin Infect Dis*. 1995; 21 (4): 943–94.
- Rasmussen, M. *Aerococci* and *aerococcal* infections. *J Infection*. 2013; 66: 467–74.
- Yaban B, Kikhney J, Musci M, Petrich A, Schmidt J, Hajduczenia M et al. *Aerococcus* *urinae* – A potent biofilm builder in endocarditis. *PLoS One*. 2020; 15: e0231827.
- Carkaci D, Højholt K, Nielsen XC, Dargis R, Rasmussen S, Skovgaard, O. et al. Genomic characterization, phylogenetic analysis, and identification of virulence factors in *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus* *urinae* strains isolated from infection episodes. *Microb Pathog*. 2017; 112: 327–40.
- Mathieu A, Delmont TO, Vogel TM, Robe P, Nalin R, Simonet P. Life on human surfaces: skin metagenomics. *PLoS One*. 2013; 8 (6): e65288.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19: 455–77.
- Lee I, Chalita M, Ha S-M, Na S-I, Yoon S-H, Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67: 2053–57.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015; 25: 1043–55.
- Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: W246–51.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: W16.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 2640–4.
- Lechner M, Findel S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12.
- Edgar RC MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 1792–7.
- Simonsen M, Mailund T, Pedersen CNS. Rapid Neighbour-Joining. In *Algorithms in Bioinformatics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; 113–22.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016; 32: 929–31.
- Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil PA. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol*. 2018; 36: 996.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68: 461–6.
- Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 19126–31.
- Narayanasamy S, King K, Dennison A, Spelman DW, Aung AK. Clinical characteristics and laboratory identification of *Aerococcus* infections: an Australian tertiary centre perspective. *Hindawi International J Microbiology*. 2017; 5684614.

## References

- Williams RE, Hirsch A, Cowan ST. *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J Gen Microbiol*. 1953; 8: 475–80.
- Tai DBG, Go JR, Fida M, Saleh JA. Management and treatment of *Aerococcus* bacteremia and endocarditis. *International J Infect Dis*. 2021; 102: 584–9.
- Rasmussen M. *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22: 22–7.
- Christensen JJ, Jensen IP, Faerk J, Kristensen B, Skov R, Korer B. The Danish ALO Study Group. Bacteremia / Septicemia Due to *Aerococcus*-Like Organisms: Report of Seventeen Cases. *Clin Infect Dis*. 1995; 21 (4): 943–94.
- Rasmussen, M. *Aerococci* and *aerococcal* infections. *J Infection*. 2013; 66: 467–74.
- Yaban B, Kikhney J, Musci M, Petrich A, Schmidt J, Hajduczenia M et al. *Aerococcus* *urinae* – A potent biofilm builder in endocarditis. *PLoS One*. 2020; 15: e0231827.
- Carkaci D, Højholt K, Nielsen XC, Dargis R, Rasmussen S, Skovgaard, O. et al. Genomic characterization, phylogenetic analysis, and identification of virulence factors in *Aerococcus sanguinicola* and *Aerococcus* *urinae* strains isolated from infection episodes. *Microb Pathog*. 2017; 112: 327–40.
- Mathieu A, Delmont TO, Vogel TM, Robe P, Nalin R, Simonet P. Life on human surfaces: skin metagenomics. *PLoS One*. 2013; 8 (6): e65288.
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19: 455–77.
- Lee I, Chalita M, Ha S-M, Na S-I, Yoon S-H, Chun J. ContEst16S: an algorithm that identifies contaminated prokaryotic genomes using 16S RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017; 67: 2053–57.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015; 25: 1043–55.
- Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B. CRISPRCasFinder, an update of CRISPRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46: W246–51.
- Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y. et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: W16.
- Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 2640–4.
- Lechner M, Findel S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics*. 2011; 12.
- Edgar RC MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 1792–7.
- Simonsen M, Mailund T, Pedersen CNS. Rapid Neighbour-Joining. In *Algorithms in Bioinformatics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; 113–22.
- Richter M, Rosselló-Móra R, Oliver Glöckner F, Peplies J. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2016; 32: 929–31.



19. Parks DH, Chuvochina M, Waite DW, Rinke C, Skarshewski A, Chaumeil PA. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nat Biotechnol.* 2018; 36: 996.
20. Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2018; 68: 461–6.
21. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 19126–31.
22. Narayanasamy S, King K, Dennison A, Spelman DW, Aung AK. Clinical characteristics and laboratory identification of *Aerococcus* infections: an Australian tertiary centre perspective. *Hindawi International J Microbiology.* 2017; 5684614.

ОСОБЕННОСТИ РЕАКТИВНОСТИ  $\mu$ -РИТМА ЭЭГ У ДЕТЕЙ С РАССТРОЙСТВАМИ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА В СИТУАЦИЯХ ПОМОГАЮЩЕГО ПОВЕДЕНИЯВ. Б. Павленко <sup>✉</sup>, А. И. Кайда, В. Н. Клинков, А. А. Михайлова, Л. С. Орехова, А. А. Португальская

Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского, Симферополь, Россия

В настоящее время обсуждается вопрос о возможной роли зеркальной системы мозга (ЗСМ), участвующей в восприятии эмоций окружающих, понимании их действий и подражании таким действиям, в нарушении социального поведения у детей с расстройствами аутистического спектра (РАС). Индикаторами активации ЗСМ считают десинхронизацию  $\mu$ -ритма ЭЭГ. Целью работы было выявить особенности реактивности ЭЭГ в индивидуально определенном частотном диапазоне  $\mu$ -ритма у детей с РАС дошкольного возраста в ситуациях, предполагающих проявление инструментального, эмоционального и альтруистического помогающего поведения (ПП). В исследовании приняли участие дети 4–7 лет с РАС ( $n = 26$ ) и их типично развивающиеся сверстники ( $n = 37$ ). Хотя в большинстве случаев нормотипичные дети демонстрировали более выраженное ПП, различия между группами статистически значимы только для альтруистического ПП ( $p < 0,01$ ) и приближаются к значимому уровню для ситуации комплексного альтруистического и эмоционального ПП ( $p = 0,09$ ). Оценка индексов реактивности  $\mu$ -ритма показала, что при выполнении задания на комплексное альтруистическое и эмоциональное ПП этот показатель статистически значимо ниже у детей с РАС в центральных отведениях левого и правого полушарий, а также в теменном отведении правого полушария (C3:  $p = 0,02$ ; C4:  $p = 0,03$ ; P4:  $p = 0,03$ ). Предполагается, что обнаруженные особенности являются следствием нарушения функционирования ЗСМ, а также нисходящей регуляции к ЗСМ со стороны префронтальной коры и других областей неокортекса. Полученные данные могут быть использованы при разработке протоколов тренировок биологической обратной связи по ЭЭГ для детей с РАС.

**Ключевые слова:** дети, аутизм, ЭЭГ,  $\mu$ -ритм, система зеркальных нейронов, просоциальное поведение

**Финансирование:** работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-28-00720, <https://rscf.ru/project/22-28-00720/>

**Вклад авторов:** Михайлова А. А., Павленко В. Б. — план исследований, обработка данных, написание статьи; Кайда А. И., Клинков В. Н., Орехова Л. С., Португальская А. А. — набор данных, обработка данных, написание статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского» (протокол № 6 от 04 июня 2020 г.). Получено информированное согласие от родителей на участие детей в эксперименте.

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Борисович Павленко  
пр. Вернадского, д. 4, г. Симферополь, 295007, Россия; vpav55@gmail.com

**Статья получена:** 19.02.2023 **Статья принята к печати:** 19.03.2023 **Опубликована онлайн:** 31.03.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.009

## FEATURES OF REACTIVITY OF THE EEG MU RHYTHM IN CHILDREN WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS IN HELPING BEHAVIOR SITUATIONS

Pavlenko VB <sup>✉</sup>, Kaida AI, Klinkov VN, Mikhailova AA, Orekhova LS, Portugalskaya AA

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

One of the subjects being discussed by the professional community currently is the role possibly played by the mirror neuron system (MNS) in the violation of social behavior of children with autism spectrum disorders (ASD). The MNS is known to shape the perception of emotions of others and understanding and imitation of their actions. Mu rhythm desynchronization in EEG is considered to be the indicator of the MNS activation. The purpose of this study was to identify the features of reactivity of the EEG mu rhythm within an individually determined frequency range in preschoolers with ASD in situations requiring instrumental, emotional and altruistic helping behavior (HB). The study involved children 4–7 years old with ASD ( $n = 26$ ) and their normally developing peers without the condition ( $n = 37$ ). Although in most cases, HB was more pronounced in the group of normally developing children, the differences between the groups are significant only for altruistic HP ( $p < 0.01$ ), and for the situation requiring complex altruistic and emotional HP it approaches significance ( $p = 0.09$ ). Evaluation of the mu rhythm reactivity indices showed that the tasks invoking complex altruistic and emotional HB bring this indicator down significantly in children with ASD compared to the group of normally developing participants, as shown by the central leads of the left and right hemispheres and the parietal lead of the right hemisphere (C3:  $p = 0.02$ ; C4:  $p = 0.03$ ; P4:  $p = 0.03$ ). It is assumed that the detected features stem from the impaired functioning of the MNS and the downstream regulation to the MNS from prefrontal cortex and other areas of the neocortex. The data obtained can be used in development of EEG biofeedback training protocols for children with ASD.

**Keywords:** children, autism, EEG,  $\mu$  rhythm, mirror neuron system, prosocial behavior

**Funding:** the work was supported by the Russian Science Foundation grant № 22-28-00720, <https://rscf.ru/project/22-28-00720/>

**Author contribution:** Mikhailova AA, Pavlenko VB — research plan, data processing, article authoring; Kaida AI, Klinkov VN, Orekhova LS, Portugalskaya AA — data collection, data processing, article authoring.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Vernadsky Crimean Federal University ethics committee (Minutes #6 of June 04, 2020). Parents of the children have agreed to their participation in the experiment in writing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir B. Pavlenko  
pr. Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007, Russia; vpav55@gmail.com

**Received:** 19.02.2023 **Accepted:** 19.03.2023 **Published online:** 31.03.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.009

Состояние физического, духовного и социального благополучия, которое входит в понятие «здоровье», тесно связано с возможностью каждого из членов общества участвовать в просоциальном поведении, помогая другим людям и получая, в свою очередь, помощь и поддержку

окружающих. Термины «просоциальное» и «помогающее поведение» (ПП) обычно отождествляют и определяют как добровольные действия, совершаемые в ответ на потребности других и направленные на их благо [1]. Выраженное снижение способности к адекватному

социальному взаимодействию объединяет такую группу нарушений развития, как расстройства аутистического спектра (РАС) [2–4]. Нарушение социального поведения является одним из препятствий для детей с РАС в реализации возможности занять полноценное место в обществе, что делает актуальным анализ его нейрофизиологических механизмов. В настоящее время наиболее обсуждаемы следующие гипотезы о причинах РАС. Предполагается, что для головного мозга людей с РАС характерны отклонения в процессе прореживания (pruning) синаптических терминалей, что приводит к атипичному количеству аксонов и синапсов. Как следствие возникают избыточность локальных соединений внутри микроучастков коры больших полушарий и недостаточность функционального взаимодействия относительно удаленных регионов, таких как фронтальные и теменные области неокортекса, что подтверждает анализ когерентности ритмов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) [5]. Согласно другой гипотезе, функциональный дефицит никотиновой ветви холинергической модулирующей системы является причиной выявленного дисбаланса возбуждения и торможения, проблем с переключением внимания, модуляции чувствительности к стимулам различной модальности у детей с РАС [6]. Наконец, около двадцати лет назад было выдвинуто предположение о нарушении при РАС функционирования зеркальной системы мозга (ЗСМ), участвующей в восприятии эмоций окружающих, понимании их действий и подражании таким действиям. Ядром ЗСМ человека являются участки неокортекса, расположенные билатерально в нижней теменной доле и вентральной премоторной коре [7–9]. В контексте изучения особенностей становления просоциального поведения у детей с РАС особенно важна проверка последнего предположения, поскольку для оказания помощи другим необходимо обладать представлениями о целях их действий, воспринимать эмоции и оценивать психические состояния окружающих, а также перенять определенные способы ПП [10].

По некоторым данным, индикатором активации ЗСМ является десинхронизация (подавление) сенсомоторного  $\mu$ -ритма (разновидность  $\alpha$ -активности) [8, 10, 11], наиболее выраженного над центральными областями коры. Это позволяет проводить исследования особенностей функционирования данной системы, в том числе у детей с РАС, используя регистрацию ЭЭГ. Авторы одной из первых работ в данной области обнаружили, что в отличие от испытуемых группы нормы, у взрослых и детей с РАС не было подавления  $\mu$ -ритма во время просмотра видеозаписей биологических движений (движений руки) [12]. Полученные результаты легли в основу выдвинутой ими гипотезы разбитого зеркала.

Целый ряд более поздних исследований, в которых анализировали ЭЭГ при предъявлении испытуемым подобных движений, не выявили различий в модуляции  $\mu$ -ритма у людей с РАС и нормотипичных индивидов [13–15]. Однако в работе, где в качестве стимулов были использованы записи эмоционально окрашенных социальных движений, а также перемещений неживых объектов, у типично развивающихся детей 7–15 лет эмоциональные стимулы показали значимо большую десинхронизацию, в то время как у их сверстников с РАС различия в десинхронизации  $\mu$ -ритма при предъявлении указанных стимулов отсутствовали [16]. При выполнении задачи, которая требовала узнавания инструментов и изображения действий с ними в виде пантомимы,

выявлено снижение величины модуляции мощности  $\mu$ -ритма ЭЭГ у детей 8–13 лет с РАС по сравнению с детьми нормотипической группы [17]. Нашей лабораторией также выявлены различия в реактивности сенсомоторных ритмов ЭЭГ у детей с РАС 5–10 лет и их нормально развивающихся сверстников в ситуациях наблюдения, имитации и слухового восприятия движений руки с компьютерной мышью. Ситуации имитации движений и восприятия перемещения мыши на слух у испытуемых контрольной группы сопровождались десинхронизацией  $\mu$ - и  $\beta$ -ритмов, а у детей с РАС такая реакция либо отсутствовала, либо происходила синхронизация  $\mu$ -ритма [18].

Анализ подобных противоречий привел к изменению «гипотезы разбитого зеркала» и созданию интегрированной модели социальной модуляции реакций ЗСМ со стороны других областей неокортекса. Модель предполагает, что зеркальные нейроны обрабатывают зрительно-моторные свойства наблюдаемых действий, в то время как медиальная префронтальная кора контролирует активность ЗСМ в зависимости от социальной значимости и контекста ситуации. Симптомы РАС возникают из-за аномалий нисходящей регуляции ЗСМ, а не внутри этой системы. В итоге при наблюдении простых движений ЗСМ людей с РАС реагирует как у нейротипичных людей. Однако сложные действия, эмоционально окрашенные и социальные стимулы часто обрабатываются неадекватно [8, 19, 20]. С учетом этой модели разработаны тренинги с применением биологической обратной связи (БОС) по ЭЭГ, которые показали определенную эффективность в коррекции проявлений РАС [21]. Тренинги основаны на компьютерных играх и включают в себя задачи на синхронизацию и десинхронизацию  $\mu$ -ритма в зависимости от игрового контекста, что обеспечивает перестройку связей ядра ЗСМ с другими областями неокортекса.

Ранее проведенные исследования показали, что дети с РАС, хотя и в меньшей степени, чем нормотипичная группа, могут проявлять просоциальное поведение в ответ на потребности других [22]. Они демонстрируют ПП в ситуациях, требующих: инструментальную помощь (instrumental helping), т. е. помощь другим людям в завершении целенаправленного действия; эмпатическую помощь (comforting), реагируя на эмоциональные нужды другого человека и вербально или физически поддерживая и утешая его; альтруистическую помощь, при которой дети делятся ресурсами (sharing), если их не достается другому индивиду. Насколько нам известно, анализ реактивности  $\mu$ -ритма ЭЭГ при реализации задач на ПП у детей с РАС в сопоставлении со здоровыми сверстниками ранее никто не проводил. Такое исследование позволило бы уточнить возможную роль дисфункции ЗСМ в организации сложного просоциального поведения у детей с аутизмом, а также могло быть полезным в разработке новых методов коррекции нарушений у детей с РАС с помощью сеансов БОС по ЭЭГ. Поскольку степень десинхронизации  $\mu$ -ритма может быть неверно оценена из-за частичного наложения на него затылочного  $\alpha$ -ритма, находящегося в близком частотном диапазоне [10], целесообразно определение индивидуальной полосы  $\mu$ -ритма, устанавливаемой при совершении ребенком самостоятельных движений. В связи с этим целью нашего исследования было выявить особенности реактивности ЭЭГ в индивидуальном частотном диапазоне  $\mu$ -ритма у детей с РАС дошкольного возраста в ситуациях, требующих оказания разных видов помощи другому человеку.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

**Характеристика выборки**

Исследование проводили на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. В нем приняли участие 64 ребенка-правши в возрасте 4–7 лет (средний возраст –  $5,7 \pm 1,2$  года), из них 26 детей с РАС (20 мальчиков и 6 девочек) и 38 типично развивающихся детей, или группа сравнения (21 мальчик и 17 девочек). Распределение детей с РАС по возрастным группам было следующим: в группе 4-х лет — 6 человек, 5-ти лет — 6 человек, 6-ти лет — 8 человек, 7-ми лет — 6 человек. Распределение типично развивающихся детей: в группе 4-х лет — 10, 5-ти лет — 8, 6-ти лет — 10, 7-ми лет — 10 человек. Распределение по возрасту детей с РАС и нормотипичных детей в этих группах не различалось. Средний возраст всех детей с РАС и в группе сравнения значимо не различался ( $5,9 \pm 1,2$  и  $5,5 \pm 1,2$  соответственно,  $p = 0,17$ ). Группу детей с РАС составили дети с диагнозом «детский аутизм» (F84.0 по МКБ-10) или «расстройства аутистического спектра с нарушением интеллектуального развития и с нарушениями функционального языка» (6A02.3 по МКБ-11). Критерии включения детей в группу сравнения: достаточный уровень когнитивного развития (IQ от 90 до 120 баллов по тесту Векслера в вариантах WPPSI и WISC); отсутствие хронических заболеваний нервной системы. Критерии включения для детей обеих групп: наличие нормального уровня зрения и слуха; предпочтение правой руки.

**Определение выраженности просоциального поведения**

Для анализа уровня выраженности ПП были использованы четыре экспериментальные ситуации. К каждой из последующих ситуаций переходили после того как ребенок выполнил задание, либо если он не оказал помощи в течение 50 с.

1. Задание на реализацию инструментального помогающего поведения (ИПП) по методике, предложенной F. Warneken, M. Tomasello [23]. На стол перед ребенком помещали коробку с небольшим отверстием сверху и открытой гранью со стороны ребенка. Затем экспериментатор ставил на коробку кружку, и как бы помешивая в ней чай, «случайно» ронял ложку в верхнее отверстие коробки. Ожидалось, что ребенок поможет достать ложку и отдаст ее экспериментатору.

2. Задание на реализацию эмоционального помогающего поведения (ЭПП) по методике с использованием клипборда [24]. Экспериментатор как бы случайно придавливал палец зажимом для бумаг с возгласом «Ой!» и демонстрировал, что ему больно (делал грустное лицо, потирал палец, вздыхал и постанывал). Анализировали, успокаивал ли ребенок экспериментатора (дотрагивался до его руки, озвучивал беспокойство о нем, направлял на него внимание родителя, чтобы тот помог и т. д.).

3. Задание на реализацию альтруистического помогающего поведения (АПП) по методике «неравное угощение» [22]. Экспериментатор доставал два прозрачных контейнера, один для себя, другой для ребенка и говорил: «Посмотри, что у меня есть». При этом в контейнере у экспериментатора пусто, а у ребенка — четыре печенья.

Экспериментатор различными способами показывал, что у него нет печенья, а у ребенка есть, делал грустное лицо, протягивал руку ладонью вверх в требовательном жесте. Оценивали, поделится ли ребенок печеньем.

4. Задание на реализацию комплекса альтруистического и эмоционального помогающего поведения (АЭПП) [25]. Экспериментатор сначала играл с ребенком, используя двух плюшевых игрушечных мишек, у одного из которых лапа прикреплена на застежке-липучке. После нескольких минут игры лапа у этой игрушки отпадала, и экспериментатор демонстрировал грустное лицо. Затем сигналы о необходимости помощи становились все более явными, например, экспериментатор произносил: «Лапа отпала! Моим мишкой теперь не поиграть!». Оценивали, в какой степени ребенок демонстрирует ПП, успокаивая либо предлагая свою игрушку.

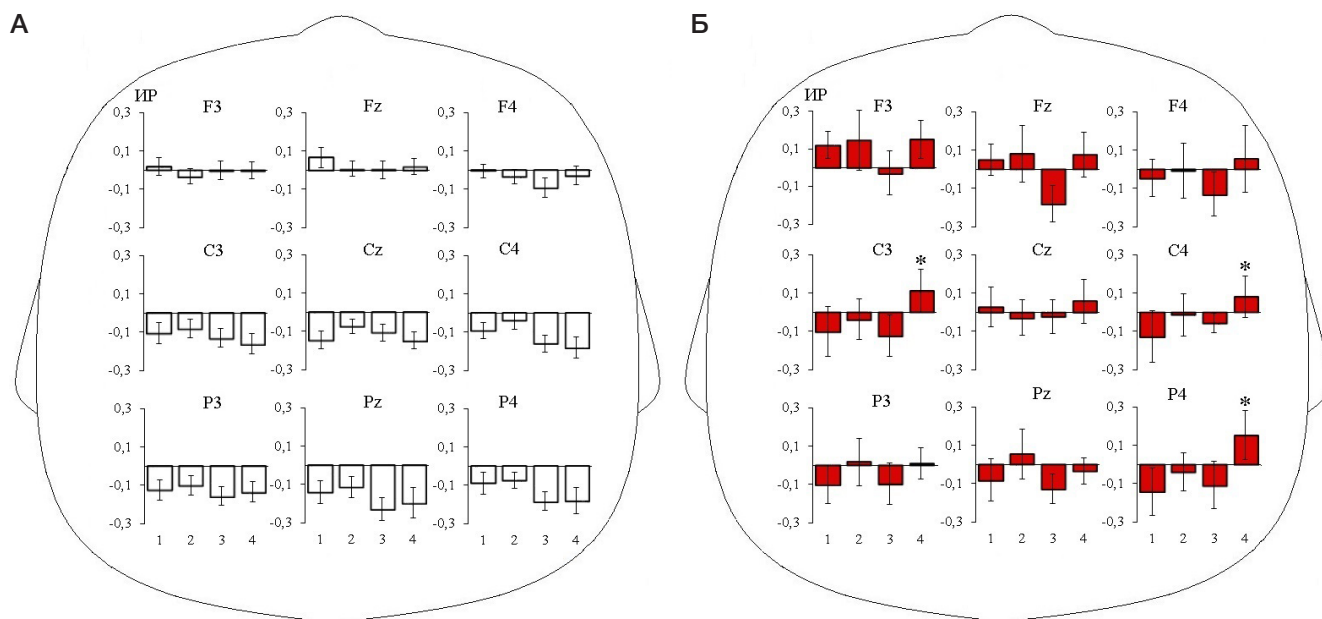
Во время выполнения заданий проводили видеорегистрацию. На основании ее анализа и критериев, описанных ранее [22–25] (оказывалась ли помощь и насколько быстро это делал ребенок, требовались ли для этого все более настойчивые стимулы со стороны экспериментатора) оценивали уровень проявления ПП по 10-балльной шкале.

**Регистрация и анализ ЭЭГ**

Регистрацию ЭЭГ осуществляли с помощью электроэнцефалографа «Нейрон-Спектр-5» («Нейрософт»; Россия) монополярно от 19 отведений по стандартной схеме 10–20% (референт — объединенные ушные электроды) в полосе пропускания сигнала 0,5–30,0 Гц при частоте дискретизации 250 Гц. Запись ЭЭГ и видеозапись экспериментальных ситуаций были синхронизированы.

Регистрацию ЭЭГ в фоновой ситуации (длительность 50 с) проводили при открытых глазах в условиях устойчивого зрительного внимания при просмотре видеозаписи вращающегося мяча. Для анализа  $\mu$ -ритма при реализации просоциального поведения отбирали такие временные периоды четырех экспериментальных ситуаций, когда ребенок сидел неподвижно, наблюдал за действиями взрослого и принимал решение об оказании той или иной помощи. Длительность таких записей зависела от времени, через которое ребенок оказывал помощь, и не превышала 50 с.

Обработку данных ЭЭГ проводили с помощью программы WinEEG («Мицар»; Россия). Артефакты удаляли с помощью встроенного в программу метода независимых компонент с дополнительным зрительным контролем качества записи. Записи ЭЭГ одного ребенка группы сравнения и семи детей с РАС содержали большое количество артефактов из-за чрезмерной двигательной активности испытуемых и были исключены из дальнейшей статистической обработки. Полученные безартефактные отрезки ЭЭГ разбивали на эпохи по 2 с. Фрагменты ЭЭГ подвергали быстрому преобразованию Фурье с взаимным перекрытием эпох 50%. Амплитуды  $\mu$ -ритма анализировали в девяти локусах: лобных (F3, Fz, F4), центральных (C3, Cz, C4), теменных (P3, Pz, P4). Указанные регионы выбраны как области интереса на основании данных литературы о целесообразности анализа  $\mu$ -ритма у детей не только в центральных, но и во фронтальных и теменных областях [26]. Амплитуду  $\mu$ -ритма ЭЭГ рассчитывали в индивидуальных для каждого испытуемого частотных диапазонах, границы которых были установлены на основе анализа различий спектров мощности ЭЭГ в



**Рис. 1.** Индексы реактивности (ИР)  $\mu$ -ритма ЭЭГ у типично развивающихся детей (А; белые столбцы) и детей с РАС (Б; красные столбцы) в ситуациях помогающего поведения. 1 — ИПП, 2 — ЭПП, 3 — АПП, 4 — АЭПП. Приведены средние значения и стандартные ошибки средних. Различия индексов реактивности у детей двух групп: \* —  $p < 0,05$

отведении С3 в состоянии двигательного покоя ребенка и при выполнении им движений (реакция десинхронизации) [27].

#### Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных данных проводили с применением программы STATISTICA 12.0 (StatSoft Inc.; США). Для оценки различий в показателях выраженности различных элементов просоциального поведения использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Для выявления особенностей реактивности ЭЭГ у детей с РАС рассчитывали индексы реактивности (ИР)  $\mu$ -ритма в соответствии с формулой  $IR = \ln(B / A)$  [13], где В — амплитуда ритма в экспериментальной ситуации, А — амплитуда ритма в фоновой ситуации. Логарифмирование применяли для нормализации распределения. Значения  $IR > 0$  свидетельствуют об увеличении амплитуды ритма в экспериментальной ситуации по сравнению с фоновым уровнем (синхронизация), а  $IR < 0$  — о снижении амплитуды ритма (десинхронизация). Различия в ИР  $\mu$ -ритма исследуемых групп оценивали с помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями (repeated measures ANOVA). Определяли влияние межсубъектного фактора ГРУППА (два уровня: дети с РАС и группа сравнения) и внутрисубъектного фактора ЛОКУС (девять отведений ЭЭГ) по схеме  $2 \times 9$ . Для расчета статистической значимости различий ИР в привязке к каждому из девяти отведений ЭЭГ использовали метод линейных контрастов. Для описания распределений, отличных от нормального (показатели просоциального поведения), применяли медиану и интерквартильный размах. В случаях нормального распределения данных (логарифмированные значения ИР) использовали среднее и стандартную ошибку среднего. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ , но в связи с небольшим объемом выборок учитывали и тенденции к наличию различий ( $p < 0,10$ ).

Из-за преобладания участников мужского пола в группе РАС мы не оценивали пол как независимую переменную.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Особенности показателей помогающего поведения у детей с РАС

Оценка выраженности элементов просоциального поведения у детей группы сравнения показала следующее: показатель ИПП составил 7,5 (2; 10), ЭПП — 1,5 (0; 3), АПП — 6,0 (4; 10), АЭПП — 8,5 (4; 10) баллов. У детей с РАС уровень ИПП составил 9,0 (1; 10), ЭПП — 0,0 (0; 3), АПП — 2,5 (0; 5), АЭПП — 3,0 (0; 10) баллов. Хотя в случае большинства экспериментальных ситуаций нормотипичные дети демонстрировали более выраженное ПП, различия между группами статистически значимы только для ситуации АПП ( $Z = 2,61, p < 0,01$ ) и приближаются к значимому уровню для АЭПП ( $Z = 1,65, p = 0,09$ ).

##### Особенности реактивности ЭЭГ в частотном диапазоне $\mu$ -ритма у детей с РАС

У нормотипичных детей во всех экспериментальных ситуациях ИР в центральных и теменных отведениях принимали отрицательные значения, что указывает на десинхронизацию ЭЭГ в диапазоне  $\mu$ -ритма (рис. 1А). Во фронтальных отведениях реактивность  $\mu$ -ритма выражена незначительно. У детей с РАС величины ИР во всех анализируемых отведениях при выполнении подобных задач принимали как положительные, так и отрицательные значения, что указывает как на десинхронизацию, так и на синхронизацию ЭЭГ в диапазоне  $\mu$ -ритма (рис. 1Б).

Результаты дисперсионного анализа различий в реактивности  $\mu$ -ритма у детей с РАС и группы сравнения свидетельствуют о статистически значимом влиянии фактора ГРУППА в задании на реализацию комплекса альтруистического и эмоционального помогающего поведения (АЭПП) (таблица). У детей группы сравнения в данной экспериментальной ситуации зарегистрировано снижение амплитуды во всех отведениях, за исключением Fz, а у группы с РАС — рост амплитуды индивидуального  $\mu$ -ритма, за исключением локуса Pz (см. рис. 1.). Применение

Таблица. Результаты дисперсионного анализа различий в реактивности  $\mu$ -ритма у детей с РАС и контрольной группы

Индексы реактивности	ГРУППА			ЛОКУС			ГРУППА $\times$ ЛОКУС		
	F1.54	$p$	$\eta^2$	F8.432	$p$	$\eta^2$	F8.432	$p$	$\eta^2$
ИР ИПП	0,1	0,74	0,002	3,64	0,0004	0,06	0,93	0,49	0,02
ИР ЭПП	0,95	0,33	0,02	1,43	0,18	0,03	0,71	0,68	0,01
ИР АПП	0,09	0,77	0,002	1,52	0,15	0,03	1,47	0,17	0,03
ИР АЭПП	4,24	0,04	0,08	1,9	0,06	0,04	1,16	0,32	0,02

метода линейных контрастов показало, что различия в ИР  $\mu$ -ритма ЭЭГ у двух групп детей достигали уровня статистической значимости в центральных отведениях левого и правого полушарий, а также в теменном отведении правого полушария (С3:  $p = 0,02$ ; С4:  $p = 0,03$ ; Р4:  $p = 0,03$ ). В заданиях на реализацию ИПП, ЭПП и АЭПП значимых различий в ИР  $\mu$ -ритма у детей с РАС и типично развивающихся сверстников не выявлено.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как и другие авторы [22, 28], мы обнаружили, что несмотря на выраженные социальные нарушения, дети с РАС действуют просоциально в ответ на потребности других и могут делать это в ситуациях, требующих разных видов помощи. Уровень ПП в ситуации, требующей инструментальной помощи, у детей с РАС был несколько выше, чем у детей группы сравнения. Возможно, это связано с интересом к восстановлению порядка объектов, который присущ детям с РАС [29]. Однако в ситуациях АПП и АЭПП дети с РАС менее склонны к оказанию помощи. Наиболее сложной для участников исследования была ситуация АЭПП — детям надо было в процессе игры оценить происходящее, воспринять аффективно окрашенные невербальные и вербальные сигналы экспериментатора, оказать ему эмоциональную помощь или даже поделиться привлекательной игрушкой. У детей с РАС в этой ситуации не только выявлена тенденция к меньшей выраженности ПП, но и обнаружены статистически значимые отличия от детей группы сравнения в паттерне ЭЭГ.

У нормотипичных детей в ситуациях, требующих оказания помощи, в центральных и теменных отведениях обнаружена десинхронизация ЭЭГ в частотном диапазоне  $\mu$ -ритма, в том числе в ситуации АЭПП. У детей с РАС такая десинхронизация в указанной ситуации отсутствовала. Как уже отмечалось, десинхронизацию  $\mu$ -ритма расценивают в качестве индикатора активации ЗСМ [10, 11]. Таким образом отсутствие депрессии  $\mu$ -ритма у детей с РАС в условиях задачи на АЭПП может указывать на меньшую степень активации ЗСМ, которая проявляется в наиболее сложной социальной ситуации. Полученные результаты, согласно которым ИР у детей исследованных групп в наибольшей степени различаются в задаче на АЭПП, согласуются с так называемой интегрированной моделью [8], основанной на модуляции реакций нервных клеток

ЗСМ со стороны префронтальной коры и других областей неокортекса в зависимости от контекста ситуации.

Причиной измененных реакций ЗСМ могут быть и затруднения с переключением внимания в сложной социальной ситуации. По мнению ряда авторов, у детей с аутизмом нарушена работа вентрального модуля внимания, который включает височно-теменной стык (temporo/parietal junction), дорсальную треть верхне-височной извилины и ряд областей вентральной фронтальной коры. Данный модуль отвечает за высвобождение внимания и его переориентировку к новым, потенциально важным стимулам [2, 6]. В связи с этим можно предположить, что пониженная способность к переключению внимания у детей с РАС (например, от направленности на собственную игру с привлекательной игрушкой к действиям и проявлениям эмоций другого человека) препятствует адекватной активации сети зеркальных нейронов, так как действия другого человека просто находятся не в фокусе внимания ребенка.

Результаты настоящего исследования указывают на возможные нарушения функционирования ЗСМ и регионов неокортекса, модулирующих ее активность, у детей с РАС в сложных социальных ситуациях, требующих проявлений альтруистического и эмоционального ПП. Выявленные особенности реактивности  $\mu$ -ритма ЭЭГ могут быть полезны для разработки новых протоколов сеансов БОС, предназначенных для коррекции развития детей с РАС. Перспективным кажется использование в таких сеансах разнообразных сигналов обратной связи, имеющих эмоциональную окраску и включенных в социальный контекст.

## ВЫВОДЫ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что дети дошкольного возраста, имеющие диагноз РАС, действуют просоциально в ответ на потребности других в ситуациях, требующих разных видов помощи. Однако в сложных социальных ситуациях они менее склонны к оказанию альтруистической и эмоциональной помощи. В подобных случаях у детей с РАС, в отличие от нормотипичных детей, в центральных и теменных отведениях отсутствует десинхронизация  $\mu$ -ритма ЭЭГ. Выявленные особенности поведения детей с РАС могут быть использованы в коррекционной работе, в том числе, при проведении сеансов БОС по ЭЭГ.

## Литература

1. Eisenberg N, Fabes RA, Spinrad T. Prosocial development. In: Eisenberg N, Damon W, Lerner RM, editors. Handbook of Child Psychology. New York: Wiley, 2006; 646–718.
2. Переверзева Д. С., Горбачевская Н. Л. Нейробиологические маркеры ранних стадий расстройств аутистического спектра. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2016; 66 (3): 289–301. DOI: 10.7868/S0044467716030102.
3. Божкова Е. Д., Баландина О. В., Коновалов А. А. Расстройства аутистического спектра: современное состояние проблемы (обзор). Современные технологии в медицине. 2020; 12 (2):

- 111–20. DOI: 10.17691/stm2020.12.2.14.
4. Салимова К. Р. Нейрофизиологические корреляты нарушения развития при расстройствах аутистического спектра (РАС). Успехи современной биологии. 2021; 141 (6): 557–66. DOI 10.31857/S0042132421060065.
  5. Ippolito G, Bertaccini R, Tarasi L, Di Gregorio F, Trajkovic J, Battaglia S, et al. The role of alpha oscillations among the main neuropsychiatric disorders in the adult and developing human brain: evidence from the last 10 years of research. *Biomedicines*. 2022; 10 (12): 3189. DOI: 10.3390/biomedicines10123189.
  6. Orekhova EV, Stroganova TA. Arousal and attention re-orienting in autism spectrum disorders: evidence from auditory event-related potentials. *Front Hum Neurosci*. 2014; 8: 34. DOI: 10.3389/fnhum.2014.00034.
  7. Лебедева Н. Н., Зуфман А. И., Мальцев В. Ю. Система зеркальных нейронов мозга: ключ к обучению, формированию личности и пониманию чужого сознания. Успехи физиологических наук. 2017; 48 (4): 16–28.
  8. Yates L, Hobson H. Continuing to look in the mirror: A review of neuroscientific evidence for the broken mirror hypothesis, EP-M model and STORM model of autism spectrum conditions. *Autism*. 2020; 24 (8): 1945–59. DOI: 10.1177/1362361320936945.
  9. Heyes C, Catmur C. What Happened to Mirror Neurons? *Perspect Psychol Sci*. 2022; 17 (1): 153–68. DOI: 10.1177/1745691621990638.
  10. Hobson HM, Bishop DVM. The interpretation of mu suppression as an index of mirror neuron activity: past, present and future. *Review R Soc Open Sci*. 2017; 4 (3): 160662. DOI: 10.1098/rsos.160662.
  11. Ларионова Е. В., Гарах Ж. В., Зайцева Ю. С. Мюритм в современных исследованиях: теоретические и методологические аспекты. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2022; 72 (1): 11–35. DOI: 10.31857/S0044467722010051.
  12. Oberman LM, Hubbard EM, McCleery JP, Altschuler EL, Ramachandran VS, Pineda JA. EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Brain Res Cogn Brain Res*. 2005; 24 (2): 190–8. DOI: 10.1016/j.cogbrainres.2005.01.014.
  13. Raymaekers R, Wiersma JR, Roeyers H. EEG study of the mirror neuron system in children with high functioning autism. *Brain Res*. 2009; 1304: 113–21. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.09.068.
  14. Fan YT, Decety J, Yang CY, Liu JL, Cheng Y. Unbroken mirror neurons in autism spectrum disorders. *J Child Psychol Psychiatry*. 2010; 51 (9): 981–8. DOI: 10.1111/j.1469-7610.2010.02269.x.
  15. Sotoodeh MS, Taheri-Torbati H, Sohrabi M, Ghoshuni M. Perception of biological motions is preserved in people with autism spectrum disorder: electrophysiological and behavioural evidences. *J Intellect Disabil Res*. 2019; 63 (1): 72–84. DOI: 10.1111/jir.12565.
  16. Hudac CM, Kresse A, Aaronson B, DesChamps TD, Webb SJ, Bernier RA. Modulation of mu attenuation to social stimuli in children and adults with 16p11.2 deletions and duplications. *J Neurodev Disord*. 2015; 7 (1): 25. DOI: 10.1186/s11689-015-9118-5.
  17. Ewen JB, Lakshmanan BM, Pillai AS, McAuliffe D, Nettles C, Hallett M, et al. Decreased modulation of EEG oscillations in high-functioning autism during a motor control task. *Front Hum Neurosci*. 2016; 10: 198. DOI: 10.3389/fnhum.2016.00198.
  18. Кайда А. И., Эйсмонт Е. В., Михайлова А. А., Павленко В. Б. Сенсомоторные ритмы ЭЭГ у детей с расстройствами аутистического спектра. Вестник РГМУ. 2020; (5): 74–81. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.055.
  19. Hamilton AF. Reflecting on the mirror neuron system in autism: a systematic review of current theories. *Dev Cogn Neurosci*. 2013; 3: 91–105. DOI: 10.1016/j.dcn.2012.09.008.
  20. Dumas G, Soussignan R, Hugueville L, Martinerie J, Nadel J. Revisiting mu suppression in autism spectrum disorder. *Brain Res*. 2014; 1585: 108–19. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.08.035.
  21. Friedrich EV, Sivanathan A, Lim T, Suttie N, Louchart S, Pillen S, et al. An effective neurofeedback intervention to improve social interactions in children with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord*. 2015; 45 (12): 4084–100. DOI: 10.1007/s10803-015-2523-5.
  22. Dunfield KA, Best LJ, Kelley EA, Kuhlmeier VA. Motivating moral behavior: helping, sharing, and comforting in young children with autism spectrum disorder. *Front Psychol*. 2019; 10: 25. DOI: 10.3389/fpsyg.2019.00025.
  23. Warneken F, Tomasello M. Altruistic helping in human infants and young chimpanzees. *Science*. 2006; 311 (5765): 1301–3. DOI: 10.1126/science.1121448.
  24. Paulus M, Kühn-Popp N, Licata M, Sodian B, Meinhardt J. Neural correlates of prosocial behavior in infancy: different neurophysiological mechanisms support the emergence of helping and comforting. *Neuroimage*. 2013; 66: 522–30. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2012.10.041.
  25. Kärtner J, Schuhmacher N, Collard J. Socio-cognitive influences on the domain-specificity of prosocial behavior in the second year. *Infant Behav Dev*. 2014; 37 (4): 665–75. DOI: 10.1016/j.infbeh.2014.08.004.
  26. Marshall PJ, Young T, Meltzoff AN. Neural correlates of action observation and execution in 14-month-old infants: An event-related EEG desynchronization study. *Dev Sci*. 2011; 14 (3): 474–80. DOI: 10.1111/j.1467-7687.2010.00991.x.
  27. Михайлова А. А., Орехова Л. С., Дягилева Ю. О., Мухтаримова Т. И., Павленко В. Б. Реактивность мю-ритма ЭЭГ при наблюдении и выполнении действий у детей раннего возраста, имеющих разный уровень развития рецептивной речи. Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова. 2020; 70 (3): 422–32. DOI: 10.31857/S0044467720030077.
  28. Wang X, Auyeung B, Pan N, Lin LZ, Chen Q, Chen JJ, et al. Empathy, Theory of Mind, and prosocial behaviors in autistic children. *Front Psychiatry*. 2022; 13:844578. DOI: 10.3389/fpsyg.2022.844578.
  29. Paulus M, Rosal-Grifoll B. Helping and sharing in preschool children with autism. *Exp Brain Res*. 2017; 235 (7): 2081–8. DOI: 10.1007/s00221-017-4947-y.

## References

1. Eisenberg N, Fabes RA, Spinrad T. Prosocial development. In: Eisenberg N, Damon W, Lerner RM, editors. *Handbook of Child Psychology*. New York: Wiley, 2006; 646–718.
2. Pereverzeva DS, Gorbachevskaya NL. Nejrobiologicheskie markery rannih stadij rasstrojstv autisticheskogo spektra. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I. P. Pavlova*. 2016; 66 (3): 289–301. DOI: 10.7868/S0044467716030102. Russian.
3. Bozhkova ED, Balandina OV, Kononov AA. Rasstrojstva autisticheskogo spektra: sovremennoe sostoyanie problemy (obzor). *Sovremennye tehnologii v medicene*. 2020; 12 (2): 111–20. DOI: 10.17691/stm2020.12.2.14. Russian.
4. Salimova KR. Nejrofiziologicheskie korrelyaty narusheniya razvitiya pri rasstrojstvah autisticheskogo spektra (RAS). *Uspеhi sovremennoj biologii*. 2021; 141 (6): 557–66. DOI 10.31857/S0042132421060065. Russian.
5. Ippolito G, Bertaccini R, Tarasi L, Di Gregorio F, Trajkovic J, Battaglia S, et al. The role of alpha oscillations among the main neuropsychiatric disorders in the adult and developing human brain: evidence from the last 10 years of research. *Biomedicines*. 2022; 10 (12): 3189. DOI: 10.3390/biomedicines10123189.
6. Orekhova EV, Stroganova TA. Arousal and attention re-orienting in autism spectrum disorders: evidence from auditory event-related potentials. *Front Hum Neurosci*. 2014; 8: 34. DOI: 10.3389/fnhum.2014.00034.
7. Lebedeva NN, Zufman AI, Mal'cev VYu. Sistema zerkal'nyh nejronov mozga: klyuch k obucheniyyu, formirovaniyyu lichnosti i ponimaniyyu chuzhogo soznaniya. *Uspеhi fiziologicheskix nauk*. 2017; 48 (4): 16–28. Russian.
8. Yates L, Hobson H. Continuing to look in the mirror: A review of neuroscientific evidence for the broken mirror hypothesis, EP-M model and STORM model of autism spectrum conditions. *Autism*. 2020; 24 (8): 1945–59. DOI: 10.1177/1362361320936945.

9. Heyes C, Catmur C. What Happened to Mirror Neurons? *Perspect Psychol Sci.* 2022; 17 (1): 153–68. DOI: 10.1177/1745691621990638.
10. Hobson HM, Bishop DVM. The interpretation of mu suppression as an index of mirror neuron activity: past, present and future. *Review R Soc Open Sci.* 2017; 4 (3): 160662. DOI: 10.1098/rsos.160662.
11. Larionova E. V., Garah Zh. V., Zajceva Yu. S. Myu-ritm v sovremennyh issledovaniyah: teoreticheskie i metodologicheskie aspekty. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I. P. Pavlova.* 2022; 72 (1): 11–35. DOI: 10.31857/S0044467722010051. Russian.
12. Oberman LM, Hubbard EM, McCleery JP, Altschuler EL, Ramachandran VS, Pineda JA. EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. *Brain Res Cogn Brain Res.* 2005; 24 (2): 190–8. DOI: 10.1016/j.cogbrainres.2005.01.014.
13. Raymaekers R, Wiersma JR, Roeyers H. EEG study of the mirror neuron system in children with high functioning autism. *Brain Res.* 2009; 1304: 113–21. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.09.068.
14. Fan YT, Decety J, Yang CY, Liu JL, Cheng Y. Unbroken mirror neurons in autism spectrum disorders. *J Child Psychol Psychiatry.* 2010; 51 (9): 981–8. DOI: 10.1111/j.1469-7610.2010.02269.x.
15. Sotoodeh MS, Taheri-Torbati H, Sohrabi M, Ghoshuni M. Perception of biological motions is preserved in people with autism spectrum disorder: electrophysiological and behavioural evidences. *J Intellect Disabil Res.* 2019; 63 (1): 72–84. DOI: 10.1111/jir.12565.
16. Hudac CM, Kresse A, Aaronson B, DesChamps TD, Webb SJ, Bernier RA. Modulation of mu attenuation to social stimuli in children and adults with 16p11.2 deletions and duplications. *J Neurodev Disord.* 2015; 7 (1): 25. DOI: 10.1186/s11689-015-9118-5.
17. Ewen JB, Lakshmanan BM, Pillai AS, McAuliffe D, Nettles C, Hallett M, et al. Decreased modulation of EEG oscillations in high-functioning autism during a motor control task. *Front Hum Neurosci.* 2016; 10: 198. DOI: 10.3389/fnhum.2016.00198.
18. Kaida AI, Eismont EV, Mikhailova AA, Pavlenko VB. EEG sensorimotor rhythms in children with autism spectrum disorders. *Bulletin of RSMU.* 2020; (5): 70–6. DOI: 10.24075/brsmu.2020.055.
19. Hamilton AF. Reflecting on the mirror neuron system in autism: a systematic review of current theories. *Dev Cogn Neurosci.* 2013; 3: 91–105. DOI: 10.1016/j.dcn.2012.09.008.
20. Dumas G, Soussignan R, Hugueville L, Martinerie J, Nadel J. Revisiting mu suppression in autism spectrum disorder. *Brain Res.* 2014; 1585: 108–19. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.08.035.
21. Friedrich EV, Sivanathan A, Lim T, Suttie N, Louchart S, Pillen S, et al. An effective neurofeedback intervention to improve social interactions in children with Autism Spectrum Disorder. *J Autism Dev Disord.* 2015; 45 (12): 4084–100. DOI: 10.1007/s10803-015-2523-5.
22. Dunfield KA, Best LJ, Kelley EA, Kuhlmeier VA. Motivating moral behavior: helping, sharing, and comforting in young children with autism spectrum disorder. *Front Psychol.* 2019; 10: 25. DOI: 10.3389/fpsyg.2019.00025.
23. Warneken F, Tomasello M. Altruistic helping in human infants and young chimpanzees. *Science.* 2006; 311 (5765): 1301–3. DOI: 10.1126/science.1121448.
24. Paulus M, Kühn-Popp N, Licata M, Sodian B, Meinhardt J. Neural correlates of prosocial behavior in infancy: different neurophysiological mechanisms support the emergence of helping and comforting. *Neuroimage.* 2013; 66: 522–30. DOI: 10.1016/j.neuroimage.2012.10.041.
25. Kärtner J, Schuhmacher N, Collard J. Socio-cognitive influences on the domain-specificity of prosocial behavior in the second year. *Infant Behav Dev.* 2014; 37 (4): 665–75. DOI: 10.1016/j.infbeh.2014.08.004.
26. Marshall PJ, Young T, Meltzoff AN. Neural correlates of action observation and execution in 14-month-old infants: An event-related EEG desynchronization study. *Dev Sci.* 2011; 14 (3): 474–80. DOI: 10.1111/j.1467-7687.2010.00991.x.
27. Mihajlova AA, Orehova LS, Dyagileva YuO, Muhtarimova TI, Pavlenko VB. Reaktivnost' myu-ritma EhEhG pri nablyudenii i vypolnenii dejstvij u detej rannego vozrasta, imeyushhiih raznyj uroven' razvitiya receptivnoj rechi. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I.P. Pavlova.* 2020; 70 (3): 422–32. DOI: 10.31857/S0044467720030077. Russian.
28. Wang X, Auyeung B, Pan N, Lin LZ, Chen Q, Chen JJ, et al. Empathy, Theory of Mind, and prosocial behaviors in autistic children. *Front Psychiatry.* 2022; 13:844578. DOI: 10.3389/fpsyg.2022.844578.
29. Paulus M, Rosal-Grifoll B. Helping and sharing in preschool children with autism. *Exp Brain Res.* 2017; 235 (7): 2081–8. DOI: 10.1007/s00221-017-4947-y.



## ЭФФЕКТ ОСНОВАННЫХ НА МЕТАПЛАСТИЧНОСТИ ПРОТОКОЛОВ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ СТИМУЛЯЦИИ ТЕТА-ВСПЫШКАМИ НА ПОКАЗАТЕЛИ РАБОЧЕЙ ПАМЯТИ

И. С. Бакулин, А. Х. Забирова <sup>✉</sup>, А. Г. Пойдашева, Д. О. Синицын, Д. Ю. Лагода, Н. А. Супонева, М. А. Пирадов

Научный центр неврологии, Москва, Россия

Исследование протоколов транскраниальной магнитной стимуляции (ТМС), основанных на метапластичности, является интенсивно изучаемым подходом к улучшению эффективности стимуляции. Однако эффекты протоколов с разным интервалом между блоками ТМС в отношении когнитивных функций изучены недостаточно. Целью работы было оценить эффект двух протоколов стимуляции тета-вспышками (iTBS) с коротким и длинным интервалами между блоками на показатели рабочей памяти (РП) у здоровых добровольцев. В случайном порядке 16 участникам проводили по одной сессии ТМС каждым протоколом (iTBS 0–15 — два блока iTBS левой дорсолатеральной префронтальной коры (лДЛПФК) с интервалом 15 мин между ними и последующей стимуляцией области вертекса через 60 мин после первого блока; iTBS 0–60 — блок iTBS лДЛПФК, блок стимуляции вертекса через 15 мин и второй блок iTBS лДЛПФК через 60 мин после первого, iTBS 0 — один блок iTBS лДЛПФК с двумя блоками стимуляции вертекса и контрольный протокол — три блока стимуляции вертекса с аналогичными интервалами). РП оценивали с помощью теста n-back перед первым, после второго и третьего блоков стимуляции. Статистически значимых эффектов протоколов на РП, а также различий между протоколами по изменению показателей теста или количеству участников, ответивших на ТМС, обнаружено не было. Тенденция к статистической значимости показана для протокола с коротким интервалом (iTBS 0–15). Кроме того, подтверждена низкая индивидуальная воспроизводимость эффекта iTBS. Перспективными представляются исследование протоколов с коротким интервалом между блоками на более крупных выборках добровольцев, а также учет других факторов, потенциально влияющих на эффект протокола (количество блоков и длительность одного блока).

**Ключевые слова:** транскраниальная магнитная стимуляция, стимуляция тета-вспышками, неинвазивная нейромодуляция, метапластичность, рабочая память, левая дорсолатеральная префронтальная кора

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-00040, <https://rscf.ru/project/21-75-00040/>.

**Вклад авторов:** И. С. Бакулин, А. Х. Забирова — планирование и дизайн исследования; И. С. Бакулин, А. Х. Забирова, А. Г. Пойдашева, Д. Ю. Лагода — проведение исследования и сбор данных; И. С. Бакулин, А. Х. Забирова, Д. О. Синицын — анализ данных; все авторы — интерпретация данных; И. С. Бакулин, А. Х. Забирова — подготовка черновика рукописи; все авторы — редактирование рукописи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол № 8-8/21 от 15 сентября 2021 г.), проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Все участники подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Альфия Ходжаевна Забирова  
Волоколамское шоссе, д. 80, г. Москва, 125367, Россия; [alfijasabirowa@gmail.com](mailto:alfijasabirowa@gmail.com)

**Статья получена:** 24.03.2023 **Статья принята к печати:** 14.04.2023 **Опубликована онлайн:** 25.04.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.011

## EFFECTS OF THE METAPLASTICITY-BASED THETA-BURST TRANSCRANIAL STIMULATION PROTOCOLS ON WORKING MEMORY PERFORMANCE

Bakulin IS, Zabirowa AH <sup>✉</sup>, Poydasheva AG, Sinitsyn DO, Lagoda DYU, Suponeva NA, Piradov MA

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

The study of the metaplasticity-based transcranial magnetic stimulation (TMS) protocols is an extensively studied approach to increase the effectiveness of stimulation. However, the effects of protocols with different intervals between the TMS blocks on cognitive functions are poorly understood. The study was aimed to assess the effects of two theta-burst transcranial stimulation (iTBS) protocols with short and long intervals between blocks on the working memory (WM) performance in healthy volunteers. A total of 16 participants were underwent a single TMS session of each protocol, which were applied in random order (iTBS 0–15 — two iTBS blocks over the left dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) iTBS with an interval of 15 min between blocks followed by stimulation of the vertex area in 60 min after the first block; iTBS 0–60 — iTBS block over the left DLPFC iTBS, block of the vertex stimulation after 15 min, and the second block of iTBS over the left DLPFC iTBS 60 min after the first one; iTBS 0 — one block of iTBS over the left DLPFC iTBS and two blocks of the vertex stimulation; control protocol — three blocks of the vertex stimulation with similar intervals). WM was assessed using the n-back test before the first block and after the second and the third stimulation blocks. No significant effects of protocols on WM or differences between protocols in alterations of test results and the responder rates to TMS between protocols were observed. The trend toward statistical significance was reported for the protocol with short interval (iTBS 0–15). Furthermore, low reproducibility of individual iTBS effect was reported. The study of protocols with short intervals between blocks involving larger cohort of volunteers and taking into account the other factors potentially influencing the effect of the protocol (number of blocks and duration of a single block) seems to be promising.

**Keywords:** transcranial magnetic stimulation, theta-burst stimulation, non-invasive brain stimulation, metaplasticity, working memory, left dorsolateral prefrontal cortex

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation (RSF), grant № 21-75-00040, <https://rscf.ru/en/project/21-75-00040/>.

**Author contribution:** Bakulin IS, Zabirowa AH — study planning and design; Bakulin IS, Zabirowa AH, Poydasheva AG, Lagoda DYU — experimentation and data acquisition; Bakulin IS, Zabirowa AH, Sinitsyn DO — data analysis; all authors — data interpretation; Bakulin IS, Zabirowa AH — writing the draft of the manuscript; all authors — manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol № 8-8/21 of 15 September 2021), it was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alfiya H. Zabirowa  
Volokolamskoye shosse, 80, Moscow, 125367, Russia; [alfijasabirowa@gmail.com](mailto:alfijasabirowa@gmail.com)

**Received:** 24.03.2023 **Accepted:** 14.04.2023 **Published online:** 25.04.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.011

Транскраниальную магнитную стимуляцию (ТМС) широко используют в клинической и исследовательской практике [1, 2]. Однако важным ограничением ее применения остается высокая вариабельность эффекта [3]. С целью повышения эффективности ТМС активно разрабатывают протоколы, основанные на механизмах метапластичности. Согласно данной концепции, величина, направление и длительность процессов синаптической пластичности зависят от предшествующей синаптической активности, при этом метапластичность может быть аддитивной или гомеостатической [4, 5]. Показано, что метапластичность оказывает значимое влияние на эффекты комбинаций протоколов ТМС [6].

Эффект комбинированных протоколов ТМС зависит как от типа отдельных блоков стимуляции, так и от интервала между ними. Влияние интервала между блоками хорошо прослеживается на примере протоколов из нескольких блоков одного типа [6–9]. На основании этих данных была сформулирована гипотеза «критического временного окна», согласно которой при проведении второго блока стимуляции в интервале средней трети от ожидаемой продолжительности эффекта одного блока индуцируется гомеостатическая метапластичность, а при меньшем и большем — аддитивная [6].

На здоровых добровольцах преимущественно были исследованы протоколы с короткими интервалами между блоками (до 20 мин) и получены противоречивые данные [7, 10, 11]. В проведенном нами исследовании двух комбинированных протоколов стимуляции интермиттирующими тета-вспышками (intermittent theta-burst stimulation, iTBS) с коротким (15 мин) и длинным (60 мин) интервалом между блоками стимуляции первичной моторной коры не было обнаружено статистически значимых эффектов отдельных протоколов и различий между протоколами при оценке эффекта на амплитуду вызванных моторных ответов (ВМО) и количество респондеров [12].

Авторы большинства работ изучали эффекты на возбудимость моторной коры. Несмотря на то что стимуляция моторной коры является удобной моделью, экстраполировать результаты на другие области коры следует с осторожностью. Важным ограничением оценки нейрофизиологического эффекта стимуляции моторной коры является вариабельность амплитуды ВМО [13]. В связи с этим целесообразно исследование стимуляции немоторных областей, а также использование для оценки эффекта поведенческих и иных показателей.

Учитывая описанные ограничения, целями настоящего исследования стали оценка эффекта протоколов iTBS с коротким и длинным интервалами между блоками стимуляции левой дорсолатеральной префронтальной коры (лДЛПФК) на показатели когнитивного теста *n*-back на вербальную рабочую память (РП) у здоровых добровольцев, а также сравнение со стандартным протоколом iTBS и стимуляцией контрольной области (вертекса). Выбор комбинированных протоколов основан на гипотезе «критического временного окна» [6].

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Участники исследования

Исследование проведено на базе ФГБНУ «Научный центр неврологии» в 2021–2022 гг. Перед включением в исследование участники заполняли опросник

противопоказаний к ТМС, для каждого осуществляли сбор медицинского анамнеза и демографических данных, проводили рутинную электроэнцефалографию (ЭЭГ) со стандартными функциональными пробами для исключения эпилептиформной активности.

Критерии включения: наличие добровольного информированного согласия; возраст 18–40 лет.

Критерии невключения: отказ от участия; наличие противопоказаний к проведению МРТ и ТМС [14]; наличие эпилептиформной активности при ЭЭГ; прием препаратов, влияющих на центральную нервную систему; наличие неврологических или психических заболеваний; наличие хронических соматических заболеваний.

Критерии исключения: тяжелые побочные эффекты, выявленные при проведении ТМС (эпилептический приступ, синкопальное состояние и др.); развитие после включения в исследование соматической, психической патологии, заболеваний нервной системы; установка электрокардиостимулятора, внутрисердечных катетеров или проведение операций на головном мозге, требующих оставления металлических предметов в полости черепа; наступление беременности; отказ от продолжения участия.

Скрининг прошли 22 добровольца, из них два человека не подошли по критериям невключения, еще двое не смогли продолжить участие в исследовании по логистическим причинам. Два человека выбыли из-за плохой переносимости ТМС. Таким образом, исследование завершили 16 участников (6 мужчин; средний возраст 28,1 лет).

### Протоколы стимуляции

Для создания индивидуальной 3D-модели головного мозга для навигационной ТМС проводили МРТ в режиме 3D-T1-MPR на приборах MAGNETOM Verio и MAGNETOM Prisma (Siemens Healthcare GmbH; Германия) (размер вокселя  $1,0 \times 0,977 \times 0,977$  мм<sup>3</sup>, 176 сагиттальных срезов).

Добровольцам проводили четыре сессии ТМС с интервалом не менее 72 ч (рис. 1А). Интервал представляется достаточным для минимизации влияния предыдущей сессии с учетом длительности эффекта блока iTBS [15]. Последовательности протоколов были рандомизированы методом латинских квадратов для минимизации эффекта порядка. По возможности все сессии проводили в одном временном интервале (9–13 или 14–18 ч). Участники не были информированы о последовательности проведения протоколов.

Были исследованы следующие протоколы (рис. 1Б):

- комбинированный протокол с коротким интервалом между блоками (iTBS 0–15): два последовательных блока реальной стимуляции с интервалом 15 мин между ними, через 60 мин от первого блока — контрольная стимуляция;
- комбинированный протокол с длинным интервалом между блоками (iTBS 0–60): блок реальной стимуляции, через 15 мин после него — контрольная стимуляция, а через 60 мин после первого блока — блок реальной стимуляции;
- стандартный протокол (iTBS 0): блок реальной стимуляции, через 15 и 60 мин после него — контрольная;
- контрольный протокол (Контроль): три блока контрольной стимуляции с интервалами 15 и 60 мин.

Для проведения iTBS был использован стимулятор MagPro X100 + MagOption (Tonica Elektronik A/S; Дания) с восьмеркообразным койлом с жидкостным охлаждением в сочетании с навигационной системой Localite TMS Navigator

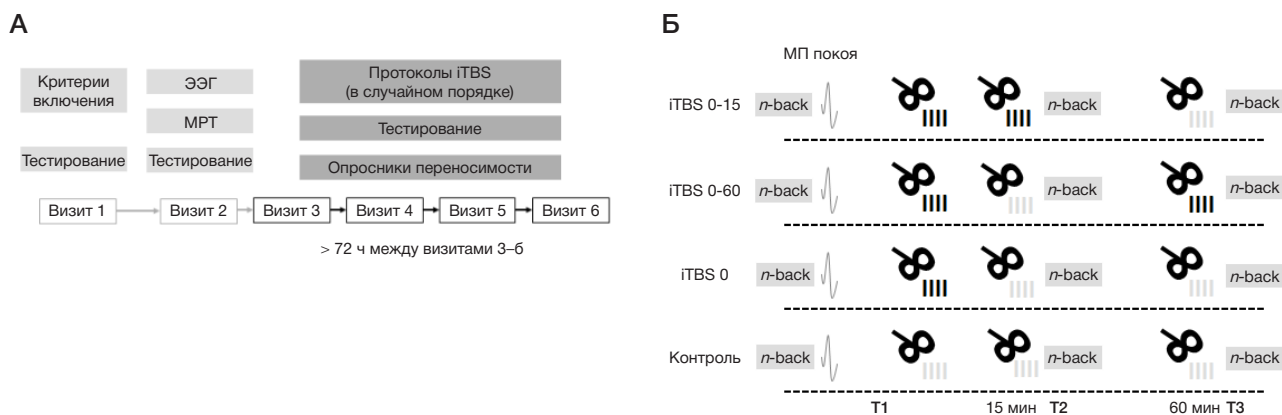


Рис. 1. А. Схема дизайна исследования. Б. Протоколы стимуляции тета-вспышками

System (Localite GmbH; Германия) и роботизированной системой позиционирования Axillum Robotics TMS-Cobot (Axillum Robotics; Франция). Блок стимуляции состоял из 20 циклов, включающих 10 вспышек по три стимула с частотой 50 Гц, подаваемых с частотой 5 Гц тройнами по 2 с с интервалом 8 с, количество стимулов в блоке — 600. В качестве мишени для реальной стимуляции использовали лДЛПФК, определяемую по МРТ как область верхней или средней лобной извилины на расстоянии около 5 см от «горячей точки» в области коркового представительства первой тыльной межкостной мышцы кисти. Мишенью для контрольной стимуляции была зона вертекса, которую определяли как середину расстояния между надпереносьем и затылочным выступом в срединной сагиттальной плоскости. Интенсивность iTBS составила 75% от моторного порога (МП) покоя, определенного по алгоритму Rossini-Rothwell, для которой ранее показан наибольший эффект [16]. МП определяли перед каждой сессией стимуляции. Для оценки переносимости заполняли опросники о нежелательных явлениях (НЯ) во время и в течение 24 ч после ТМС.

### Когнитивное тестирование

Для тестирования использовали ПО свободного доступа «The Psychology Experiment Building Language» (PEBL) [17]. Проводили тест *n*-back с вербальными стимулами (согласные буквы латинского алфавита) с  $n = 2, 3, 4$  (22, 23 и 24 стимула в задании, по 6 совпадающих для каждого  $n$ ). Участникам дважды проводили тренировочное тестирование с целью минимизации эффекта научения; кроме того, при первом тестировании перед каждой сессией проводили вводный тренировочный тест с  $n = 1$  и 2. Оценивали показатели трижды: до начала первого блока стимуляции (T1), а также непосредственно после второго (T2) и третьего (T3) блоков стимуляции.

Точность выполнения теста *n*-back оценивали путем расчета показателя  $d'$  [18].

$$d' = Z(\text{hit rate}) - Z(\text{false alarm rate}).$$

Для расчета учитывали число правильных нажатий клавиши в ответ на совпадающий стимул, нормированных на общее число совпадающих стимулов (hit rate), и ложных нажатий в ответ на несовпадающий стимул, нормированных на общее число несовпадающих для каждого  $n$  (false alarm rate). Для каждого из нормированных показателей проводили Z-преобразование.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью пакета IBM SPSS Statistics (v.23) (IBM, SPSS Inc.; США). С помощью критерия Уилкоксона провели тестирование индивидуального эффекта каждого протокола в T2 и T3 (сравнение показателей с T1). Эффект протокола в T2 и T3 оценивали как разность показателя  $d'$  в данной временной точке с показателем в T1. Для сравнения эффекта между разными протоколами в T2 и T3 использовали критерий Фридмана.

В зависимости от изменения показателя  $d'$  в T2 и T3 участники были разделены на респондеров (в отношении фасилитации, если разность была выше 0, и ингибирования, если ниже) и нереспондеров (разность показателей, равная 0). Доли респондеров сравнивали между протоколами с помощью биномиального критерия (точная версия критерия МакНемара).

Дополнительно провели два анализа воспроизводимости эффекта комбинации блока активной стимуляции и стимуляции вертекса (T2 в протоколах iTBS 0–60 и iTBS 0) с помощью коэффициента корреляции Спирмена и анализа ассоциации типа ответа в T2 с использованием точного критерия Фишера.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Оценка эффекта для отдельных протоколов

При оценке влияния протоколов на точность теста *n*-back в T2 и T3 статистически значимых различий обнаружено не было (табл. 1). Минимальные уровни значимости получены для точности выполнения теста *n*-back с  $n = 2$  после второго блока стимуляции протокола iTBS 0–15 ( $p = 0,058$ ), а также для  $n = 3$  после третьего блока стимуляции этого же протокола ( $p = 0,054$ ), при введении поправки Бонферрони откорректированные  $p = 1$ .

Для каждого протокола подсчитаны доли участников с разным ответом на ТМС в T2 и T3 (рис. 2).

#### Сравнение эффекта между протоколами

Между протоколами статистически значимых различий эффекта обнаружено не было ни для одного значения  $n$  при сравнении в T2 (критерий Фридмана; неоткорректированное  $p = 0,6; 0,62$  и  $0,428$  для  $n = 2, 3, 4$  соответственно) и в T3 ( $p = 0,283, 0,294$  и  $0,13$ ). Различий не обнаружено при сравнении эффекта непосредственно

Таблица 1. Влияние протоколов iTBS на показатели точности в тесте *n*-back

Протокол	T2-T1	<i>p</i>	T3-T1	<i>p</i>
<i>n</i> = 2				
iTBS0-15	0	0,058	0	1
iTBS0-60	0	0,874	0,0435	0,2
iTBS0	0	0,502	0	0,866
Контроль	0	0,331	0	0,362
<i>n</i> = 3				
iTBS0-15	-0,003	0,363	0,555	0,054
iTBS0-60	-0,397	0,094	0,208	0,865
iTBS0	0,129	0,507	-0,106	0,851
Контроль	-0,268	0,495	0	0,944
<i>n</i> = 4				
iTBS0-15	0,186	0,28	0,292	0,624
iTBS0-60	0,058	0,875	-0,360	0,293
iTBS0	0,405	0,094	-0,484	0,14
Контроль	0	0,826	-0,405	0,078

**Примечание:** T2-T1 — медиана разности показателей *d'* между T2 и T1; T3-T1 — между T3 и T1; значения *p* приведены без коррекции.

после двух блоков активной стимуляции, т. е. между iTBS 0-15 в T2 и iTBS 0-60 в T3 (критерий Уилкоксона; неоткорректированное  $p = 0,372$ ;  $p = 0,535$ ;  $p = 0,211$  для  $n = 2, 3$  и 4).

#### Анализ различий направления эффекта протоколов ТМС

В отношении доли участников с фасилитацией статистически значимых различий обнаружено не было (табл. 2). Значения  $p < 0,05$  без коррекции получены при сравнении доли испытуемых с ингибированием протоколами iTBS 0-15 и iTBS 0-60 в T2 для  $n = 2$  и протоколами iTBS 0-15 и контрольным в T3 для  $n = 4$ . Кроме того, значение  $p < 0,05$  получено при сравнении ингибирования протоколами iTBS 0 и iTBS 0-60 в точке T2. С поправкой Бонферрони эти тесты имеют откорректированное  $p = 1$ .

#### Анализ воспроизводимости эффекта

Для  $n = 2$  получено значение  $p = 0,02$  (отрицательная выборочная корреляция Спирмена), с поправкой Бонферрони откорректированное значение  $p = 0,06$  (табл. 3).

При анализе ассоциации как фасилитации, так и ингибирования между протоколами iTBS 0-60 и iTBS 0 не было показано статистически значимых корреляций (табл. 4). Кроме того, лишь у 6 из 16 участников (37,5%) наблюдалась фасилитация в T2 для  $n = 4$  в обоих протоколах iTBS 0-60 и iTBS 0, в то время как для тестов с меньшим уровнем сложности не было участников, у которых наблюдался фасилитирующий ответ на оба протокола.

#### Переносимость протоколов

Исследованные протоколы ТМС характеризовались благоприятным профилем безопасности. Серьезных НЯ зарегистрировано не было. В двух случаях добровольцы прекратили участие в исследовании из-за плохой переносимости (развитие интенсивных болевых ощущений во время стимуляции лДЛПФК и головной боли во время

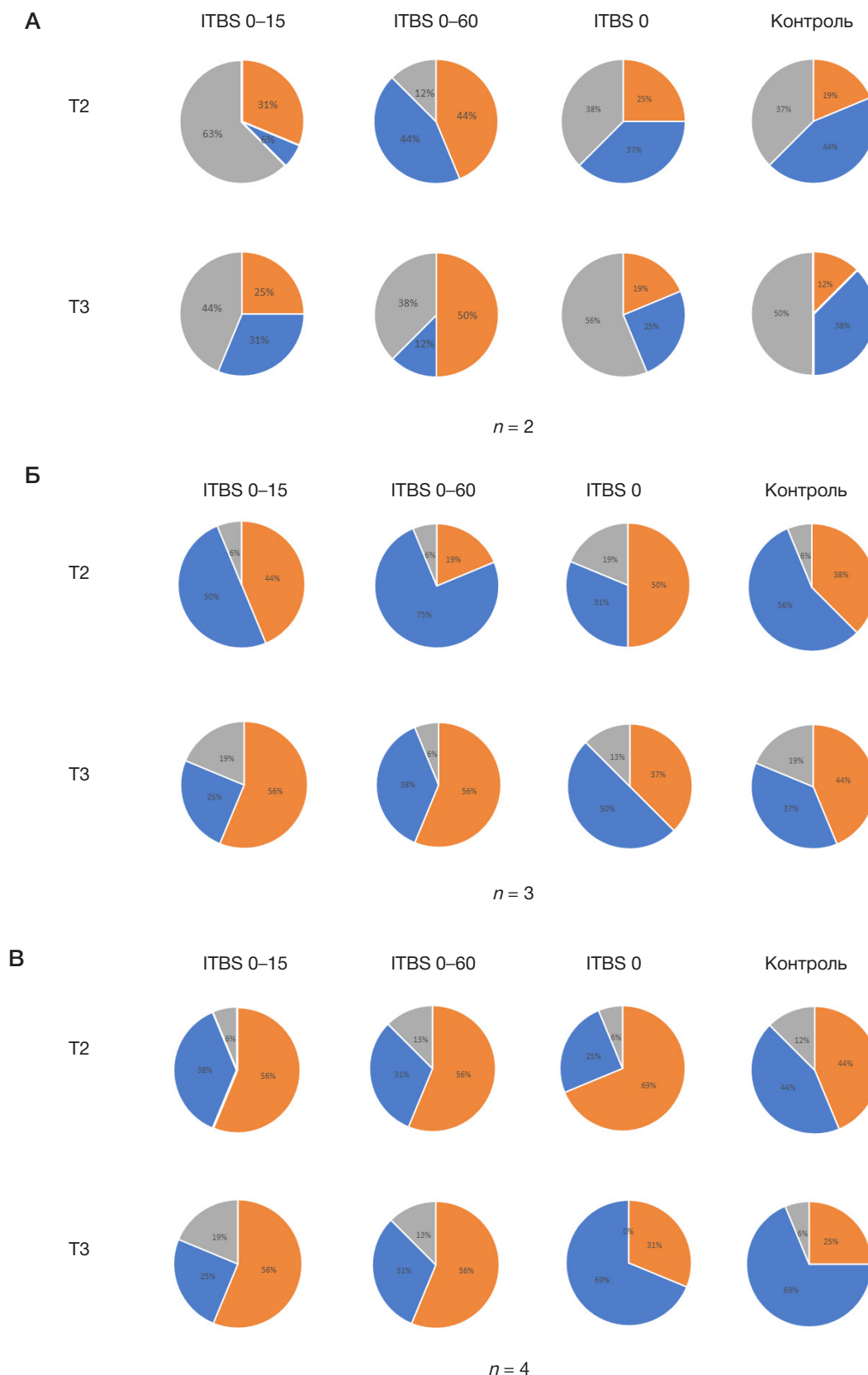
стимуляции вертекса, сохранявшейся в течение нескольких часов после завершения стимуляции и купированной приемом ибупрофена). НЯ зарегистрированы во время 67,2% и в течение 24 ч — после 8% от проанализированных сессий, имели легкий характер и не влияли на желание продолжать участие в исследовании. Наиболее часто во время стимуляции регистрировались боль и сонливость (по 28,3%), а также сокращения мимической мускулатуры вблизи лДЛПФК (9%), в течение 24 ч зарегистрирована только головная боль (8%).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании проведена оценка эффекта двух протоколов стимуляции лДЛПФК тета-вспышками, основанных на метапластичности, с коротким и длинным интервалом между блоками на показатели РП у здоровых лиц, а также сравнение эффекта со стандартным и контрольным протоколами. Также оценены различия количества участников с одинаковым направлением эффекта стимуляции в разных протоколах. Используемые протоколы были безопасными и имели хорошую переносимость. Убедительных данных в пользу эффективности отдельных протоколов в отношении РП или вариабельности ответа на стимуляцию получено не было. Показана низкая индивидуальная воспроизводимость эффекта iTBS.

Эффект одного блока iTBS на показатели РП у здоровых лиц исследован в ряде работ, однако их результаты противоречивы [16, 19–21]. Одним из источников различий может быть вариабельность ответа на стимуляцию, подтвержденная для эффекта на возбужденность моторной коры [22, 23]. В то же время, в отношении РП вариабельность эффекта iTBS до настоящего времени изучена мало.

Использование протоколов, основанных на метапластичности, является потенциальным методом увеличения эффективности ТМС, однако вопросы оптимального интервала между блоками стимуляции остаются открытыми. Мы сравнили влияние протоколов с коротким и длинным интервалами между блоками активной стимуляции на показатели РП. Статистически



**Рис. 2.** Доли участников с разным типом ответа на протоколы ТМС (А — для *n* = 2, Б — для *n* = 3, В — для *n* = 4). Оранжевым цветом показана фасилитация, синим — ингибирование, серым — отсутствие ответа

значимых различий между показателями тестирования для отдельных протоколов показано не было. Кроме того, изменения точности теста *n*-back в обеих временных точках не различались статистически значимо при сравнении протоколов, основанных на метапластичности,

со стандартным и контрольным протоколом. Не было обнаружено также статистически значимых различий между протоколами по количеству участников, у которых в ответ на стимуляцию наблюдалось улучшение выполнения тестирования (фасилитация) или его

Таблица 2. Уровни значимости для сравнения количества участников с разными типами ответа между протоколами (без коррекции)

n	T	iTBS 0–15 против iTBS 0–60	iTBS 0–15 против iTBS 0	iTBS 0–15 против Контроль	iTBS 0–60 против iTBS 0	iTBS 0–60 против Контроль	iTBS 0 против Контроль
Фасилитация							
n = 2	T2	0,726	1	0,688	0,549	0,289	1
	T3	0,289	1	0,688	0,18	0,07	1
n = 3	T2	0,289	1	1	0,227	0,375	0,754
	T3	1	0,508	0,754	0,508	0,688	1
n = 4	T2	1	0,727	0,688	0,727	0,754	0,219
	T3	0,289	0,289	0,125	1	1	1
Ингибирование							
n = 2	T2	0,031	0,125	0,07	1	1	1
	T3	1	1	0,453	0,688	0,289	0,688
n = 3	T2	0,219	0,549	1	0,039	0,375	0,289
	T3	0,688	0,289	0,727	0,754	1	0,727
n = 4	T2	1	0,727	1	1	0,727	0,375
	T3	0,07	0,065	0,039	1	1	1

ухудшение (ингибирование). Эти результаты согласуются с полученными нами ранее данными при исследовании эффекта на возбудимость моторной коры [12].

В то же время обращает на себя внимание возможная тенденция к статистической значимости эффектов протокола с коротким интервалом между блоками (iTBS 0–15) для теста *n*-back с *n* = 2 при измерении после второго блока и с *n* = 3 — после третьего. В исследуемой выборке в данном протоколе тоже наблюдалось меньшее количество участников с ингибирующим ответом после второго блока стимуляции по сравнению с протоколом iTBS 0–60 для *n* = 2 и после третьего блока по сравнению с контрольным протоколом для *n* = 4. Интересно отметить, что эффективность протокола стимуляции из трех блоков с интервалом 15 мин между ними показана в отношении визуально-пространственной РП и исполнительных функций [24], а также принятия решений у здоровых лиц [25]. Кроме того, показан положительный эффект 14 сессий стимуляции данным протоколом на когнитивные функции у пациентов с болезнью Альцгеймера [26]. На наш взгляд, представляется целесообразным дальнейшее изучение эффектов протоколов с коротким интервалом между блоками (15 мин) на когнитивные функции.

Дополнительно проанализирована воспроизводимость эффекта протоколов iTBS 0–60 и iTBS 0 после второго блока стимуляции. Не было показано как статистически значимой корреляции эффекта, так и ассоциации направления ответа между двумя протоколами. Доля участников с фасилитацией в обоих протоколах оказалась равной нулю при оценке теста с *n* = 2 и 3, для *n* = 4 она составила 37,5%. Полученные данные согласуются с результатами проведенных ранее исследований вариабельности ответа на один блок стимуляции тета-вспышками в отношении моторной коры [7, 22, 23].

Таблица 3. Корреляция эффектов двух повторений комбинации блока активной стимуляции и стимуляции вертекса (T2 в протоколах iTBS 0–60 и iTBS 0) на точность в тесте *n*-back

Показатель	n = 2		n = 3		n = 4	
	$\rho$	<i>p</i>	$\rho$	<i>p</i>	$\rho$	<i>p</i>
iTBS 0–60 против iTBS 0 (T2)	-0,573	0,02	-0,157	0,563	0,274	0,304

Примечание:  $\rho$  — коэффициент корреляции Спирмена, *p* — уровень значимости без коррекции.

Можно сделать вывод, что ответ на iTBS имеет низкую внутрииндивидуальную воспроизводимость как в отношении возбудимости моторной коры, так и в отношении когнитивных показателей. Поскольку в нашем исследовании источники вариабельности, обусловленные анатомией и изменениями положения койла, были минимизированы путем навигации по MPT и использования роботизированной системы для позиционирования койла, можно предположить, что причиной недостаточной воспроизводимости эффекта стимуляции является внутрииндивидуальная вариабельность ответа на iTBS.

Отсутствие эффекта стимуляции в нашем исследовании может быть обусловлено недостаточным количеством блоков активной стимуляции. Не обнаружено статистически значимого эффекта от двух блоков iTBS лДЛПФК с интервалом 15 мин на показатели теста *n*-back и в исследовании, опубликованном ранее [21]. Предположение о более высокой эффективности протоколов, состоящих из трех блоков, согласуется с результатами проведенного ранее исследования, в котором показан статистически значимый эффект трех, но не двух блоков стимуляции моторной коры с интервалом 15 мин [27] и с полученными ранее данными по эффективности протокола стимуляции ДЛПФК, состоящего из трех блоков с интервалом 15 мин [24]. Следует отметить, что основанные на метапластичности протоколы стимуляции, для которых показана клиническая эффективность, например, в отношении фармакорезистентной депрессии [28, 29] или спастичности при рассеянном склерозе [30], состоят из 10 и трех блоков стимуляции соответственно.

Кроме того, влияние может оказывать длительность одного блока. В протоколах, для которых показана клиническая эффективность, используют пролонгированные блоки стимуляции (1800 стимулов по

**Таблица 4.** Анализ ассоциации направлений ответов на два повторения комбинации блока активной стимуляции и стимуляции вертекса (T2 в протоколах iTBS 0–60 и iTBS 0)

Фасилитация				
<i>n</i> = 2		Фасилитация в iTBS 0	Нет фасилитации в iTBS 0	<i>p</i> = 0,088
	Фасилитация в iTBS 0–60	0/16	7/16	
	Нет фасилитации в iTBS 0–60	4/16	5/16	
<i>n</i> = 3		Фасилитация в iTBS 0	Нет фасилитации в iTBS 0	<i>p</i> = 0,200
	Фасилитация в iTBS 0–60	0/16	3/16	
	Нет фасилитации в iTBS 0–60	8/16	5/16	
<i>n</i> = 4		Фасилитация в iTBS 0	Нет фасилитации в iTBS 0	<i>p</i> = 1
	Фасилитация в iTBS 0–60	6/16	3/16	
	Нет фасилитации в iTBS 0–60	5/16	2/16	
Ингибирование				
<i>n</i> = 2		Ингибирование в iTBS 0	Нет ингибирования в iTBS 0	<i>p</i> = 0,633
	Ингибирование в iTBS 0–60	2/16	5/16	
	Нет ингибирования в iTBS 0–60	4/16	5/16	
<i>n</i> = 3		Ингибирование в iTBS 0	Нет ингибирования в iTBS 0	<i>p</i> = 1
	Ингибирование в iTBS 0–60	4/16	8/16	
	Нет ингибирования в iTBS 0–60	1/16	3/16	
<i>n</i> = 4		Ингибирование в iTBS 0	Нет ингибирования в iTBS 0	<i>p</i> = 0,546
	Ингибирование в iTBS 0–60	2/16	3/16	
	Нет ингибирования в iTBS 0–60	2/16	9/16	

**Примечание:** *p* — уровень значимости без коррекции (точный тест Фишера).

сравнению с 600 в стандартном) [28–30]. Но до настоящего времени эффекты пролонгированных блоков iTBS на когнитивные функции изучены мало.

К ограничениям проведенного исследования можно отнести малый размер группы, однако описанное исследование носит пилотный характер, и данной выборки может быть достаточно для обнаружения больших эффектов и выбора наиболее эффективных протоколов для изучения на больших группах. Кроме того, кроссоверный дизайн потенциально мог повлиять на результаты тестирования за счет эффекта научения. В то же время влияние данного эффекта представляется минимальным: во-первых, при повторных тестированиях внутри протокола он контролируется путем сравнения с протоколом с идентичным количеством блоков стимуляции вертекса. Во-вторых, благодаря рандомизации с использованием метода латинских квадратов среднее значение эффектов в сессиях с данным протоколом не зависит от возможных эффектов порядкового номера сессии, т. е. возможное научение между сессиями не вызывает смещения в оценках контрастов между протоколами.

Ограничением исследования может также быть использование только одного теста *n*-back с вербальными стимулами. Однако его широко применяют в нейропсихологических исследованиях для оценки РП. Необходимо также учитывать эффект «потолка» в тесте с наименьшей сложностью (*n* = 2), который может объяснять

большое количество нереспондеров при данном *n*. Другим ограничением может быть малое количество стимулов в задании, что необходимо учитывать в дальнейших исследованиях. Кроме того, мы оценивали эффекты стимуляции сразу после второго и третьего блока, что не позволяет исключить возможных отсроченных эффектов [19].

Следует отметить, что отсутствие эффекта основанных на метапластичности протоколов у здоровых добровольцев как на показатели когнитивного тестирования, так и на нейрофизиологические показатели, не является тождественным отсутствию клинической эффективности. Важно учитывать, что процессы метапластичности могут различаться у пациентов и здоровых добровольцев, поэтому переносить данные в клиническую практику следует с осторожностью.

## ВЫВОДЫ

В проведенном исследовании не получено убедительных данных в пользу эффективности протоколов, основанных на метапластичности, на показатели РП и направление ответа на стимуляцию у здоровых лиц. С учетом его результатов и ограничений представляется перспективным дальнейшее изучение эффекта протоколов с коротким интервалом между блоками, состоящих из большего количества блоков стимуляции, а также пролонгированных блоков iTBS.

## Литература

- Beynel L, Appelbaum LG, Luber B, Crowell CA, Hilbig SA, Lim W, et al. Effects of online repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on cognitive processing: A meta-analysis and recommendations for future studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019; 107: 47–58. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.08.018. PMID: 31473301; PMCID: PMC7654714.
- Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol*. 2020; 131 (2): 474–528. DOI: 10.1016/j.clinph.2019.11.002. PMID: 31901449.
- Goldsworthy MR, Hordacre B, Rothwell JC, Ridding MC. Effects of rTMS on the brain: is there value in variability? *Cortex*. 2021; 139: 43–59. DOI: 10.1016/j.cortex.2021.02.024. PMID: 33827037.
- Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 1996; 19 (4): 126–30. DOI: 10.1016/s0166-2236(96)80018-x. PMID: 8658594.
- Бакулин И. С., Пойдашева А. Г., Забирова А. Х., Супонева Н. А., Пирадов М. А. Метопластичность и неинвазивная стимуляция мозга: поиск новых биомаркеров и направлений терапевтической нейромодуляции. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2022; 16 (3): 74–82. DOI: 10.54101/ACEN.2022.3.9.
- Hassanzahraee M, Zoghi M, Jaberzadeh S. How different priming stimulations affect the corticospinal excitability induced by noninvasive brain stimulation techniques: a systematic review and meta-analysis. *Rev Neurosci*. 2018; 29 (8): 883–99. DOI: 10.1515/revneuro-2017-0111. PMID: 29604209.
- Tse NY, Goldsworthy MR, Ridding MC, Coxon JP, Fitzgerald PB, Fornito A, et al. The effect of stimulation interval on plasticity following repeated blocks of intermittent theta burst stimulation. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 8526. DOI: 10.1038/s41598-018-26791-w. PMID: 29867191.
- Thomson AC, Sack AT. How to Design Optimal Accelerated rTMS Protocols Capable of Promoting Therapeutically Beneficial Metaplasticity. *Front Neurol*. 2020; 11: 599918. DOI: 10.3389/fneur.2020.599918. PMID: 33224103.
- Yu F, Tang X, Hu R, Liang S, Wang W, Tian S, et al. The After-Effect of Accelerated Intermittent Theta Burst Stimulation at Different Session Intervals. *Front Neurosci*. 2020; 14: 576. DOI: 10.3389/fnins.2020.00576. Erratum in: *Front Neurosci*. 2021; 15: 687972. PMID: 32670006.
- Gamboa OL, Antal A, Laczó B, Moliadze V, Nitsche MA, Paulus W. Impact of repetitive theta burst stimulation on motor cortex excitability. *Brain Stimul*. 2011; 4 (3): 145–51. DOI: 10.1016/j.brs.2010.09.008. PMID: 21777874.
- Murakami T, Müller-Dahlhaus F, Lu MK, Ziemann U. Homeostatic metaplasticity of corticospinal excitatory and intracortical inhibitory neural circuits in human motor cortex. *J Physiol*. 2012; 590 (22): 5765–81. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.238519. PMID: 22930265.
- Bakulin I, Zabirova A, Sinitsyn D, Poydashева A, Lagoda D, Suponeva N, et al. Adding a Second iTBS Block in 15 or 60 Min Time Interval Does Not Increase iTBS Effects on Motor Cortex Excitability and the Responder Rates. *Brain Sci*. 2022; 12 (8): 1064. DOI: 10.3390/brainsci12081064. PMID: 36009127.
- Vallence AM, Goldsworthy MR, Hodyl NA, Semmler JG, Pitcher JB, Ridding MC. Inter- and intra-subject variability of motor cortex plasticity following continuous theta-burst stimulation. *Neuroscience*. 2015; 304: 266–78. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.043. PMID: 26208843.
- Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol*. 2009; 120 (12): 2008–39. DOI: 10.1016/j.clinph.2009.08.016. PMID: 19833552.
- Rounis E, Huang YZ. Theta burst stimulation in humans: a need for better understanding effects of brain stimulation in health and disease. *Exp Brain Res*. 2020; 238 (7–8): 1707–14. DOI: 10.1007/s00221-020-05880-1. PMID: 32671422.
- Chung SW, Rogasch NC, Hoy KE, Sullivan CM, Cash RFH, Fitzgerald PB. Impact of different intensities of intermittent theta burst stimulation on the cortical properties during TMS-EEG and working memory performance. *Hum Brain Mapp*. 2018; 39 (2): 783–802. DOI: 10.1002/hbm.23882. PMID: 29124791.
- Mueller ST, Piper BJ. The Psychology Experiment Building Language (PEBL) and PEBL Test Battery. *J Neurosci Methods*. 2014; 222: 250–9. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.10.024. PMID: 24269254.
- Haatveit BC, Sundet K, Hugdahl K, Ueland T, Melle I, Andreassen OA. The validity of d prime as a working memory index: results from the "Bergen n-back task". *J Clin Exp Neuropsychol*. 2010; 32 (8): 871–80. DOI: 10.1080/13803391003596421. PMID: 20383801.
- Hoy KE, Bailey N, Michael M, Fitzgibbon B, Rogasch NC, Saeki T, et al. Enhancement of Working Memory and Task-Related Oscillatory Activity Following Intermittent Theta Burst Stimulation in Healthy Controls. *Cereb Cortex*. 2016; 26 (12): 4563–73. DOI: 10.1093/cercor/bhv193. PMID: 26400923.
- Viejo-Sobera R, Redolar-Ripoll D, Boixadós M, Palau M, Valero-Cabré A, Marron EM. Impact of Prefrontal Theta Burst Stimulation on Clinical Neuropsychological Tasks. *Front Neurosci*. 2017; 11: 462. DOI: 10.3389/fnins.2017.00462. PMID: 28867993.
- Chung SW, Rogasch NC, Hoy KE, Fitzgerald PB. The effect of single and repeated prefrontal intermittent theta burst stimulation on cortical reactivity and working memory. *Brain Stimul*. 2018; 11 (3): 566–74. DOI: 10.1016/j.brs.2018.01.002. PMID: 29352668.
- Perellón-Alfonso R, Kralik M, Pileckyte I, Princic M, Bon J, Matzhold C, et al. Similar effect of intermittent theta burst and sham stimulation on corticospinal excitability: A 5-day repeated sessions study. *Eur J Neurosci*. 2018; 48 (4): 1990–2000. DOI: 10.1111/ejn.14077. PMID: 30022548.
- Boucher PO, Ozdemir RA, Momi D, Burke MJ, Jannati A, Fried PJ, et al. Sham-derived effects and the minimal reliability of theta burst stimulation. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 21170. DOI: 10.1038/s41598-021-98751-w. PMID: 34707206.
- Wu X, Wang L, Geng Z, Wei L, Yan Y, Xie C, et al. Improved Cognitive Promotion through Accelerated Magnetic Stimulation. *eNeuro*. 2021; 8 (1): ENEURO.0392-20.2020. DOI: 10.1523/ENEURO.0392-20.2020. PMID: 33452108.
- Wang L, Wu X, Ji GJ, Xiao G, Xu F, Yan Y, et al. Better modulation for risk decision-making after optimized magnetic stimulation. *J Neurosci Res*. 2021; 99 (3): 858–71. DOI: 10.1002/jnr.24772. PMID: 33617027.
- Wu X, Ji GJ, Geng Z, Wang L, Yan Y, Wu Y, et al. Accelerated intermittent theta-burst stimulation broadly ameliorates symptoms and cognition in Alzheimer's disease: A randomized controlled trial. *Brain Stimul*. 2022; 15 (1): 35–45. DOI: 10.1016/j.brs.2021.11.007. PMID: 34752934.
- Nettekoven C, Volz LJ, Kutscha M, Pool EM, Rehme AK, Eickhoff SB, et al. Dose-dependent effects of theta burst rTMS on cortical excitability and resting-state connectivity of the human motor system. *J Neurosci*. 2014; 34 (20): 6849–59. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4993-13.2014. PMID: 24828639.
- Пойдашева А. Г., Бакулин И. С., Синицын Д. О., Забирова А. Х., Супонева Н. А., Масленников Н. В. и др. Опыт применения Стэнфордской нейромодулирующей терапии у пациентов с терапевтически резистентной депрессией. *Вестник РГМУ*. 2022; (4): 35–42. DOI: 10.24075/vrgmu.2022.044
- Cole EJ, Phillips AL, Bentzley BS, Stimpson KH, Nejad R, Bamak F, et al. Stanford Neuromodulation Therapy (SNT): A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry*. 2022; 179 (2): 132–41. DOI: 10.1176/appi.ajp.2021.20101429. PMID: 34711062.
- Бакулин И. С., Пойдашева А. Г., Забирова А. Х., Лагода Д. Ю., Римкевичус А. А., Захарова М. Н. и др. Первый опыт терапевтической транскраниальной магнитной стимуляции при прогрессирующем рассеянном склерозе и спастичности по протоколу, основанному на метопластичности. *Нервно-мышечные болезни*. 2022; 12 (3): 26–35. DOI: 10.17650/2222-8721-2022-12-3-26-35.



## References

1. Beynel L, Appelbaum LG, Luber B, Crowell CA, Hilbig SA, Lim W, et al. Effects of online repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on cognitive processing: A meta-analysis and recommendations for future studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019; 107: 47–58. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.08.018. PMID: 31473301; PMCID: PMC7654714.
2. Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, Benninger DH, Brunelin J, Di Lazzaro V, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): An update (2014–2018). *Clin Neurophysiol*. 2020; 131 (2): 474–528. DOI: 10.1016/j.clinph.2019.11.002. PMID: 31901449.
3. Goldsworthy MR, Hordacre B, Rothwell JC, Ridding MC. Effects of rTMS on the brain: is there value in variability? *Cortex*. 2021; 139: 43–59. DOI: 10.1016/j.cortex.2021.02.024. PMID: 33827037.
4. Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci*. 1996; 19 (4): 126–30. DOI: 10.1016/s0166-2236(96)80018-x. PMID: 8658594.
5. Bakulin IS, Poydasheva AG, Zabirowa AH, Suponeva NA, Piradov MA. Metaplasticity and non-invasive brain stimulation: the search for new biomarkers and directions for therapeutic neuromodulation. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2022; 16(3): 74–82. Russian. DOI: 10.54101/ACEN.2022.3.9.
6. Hassanzahraee M, Zoghi M, Jaberzadeh S. How different priming stimulations affect the corticospinal excitability induced by noninvasive brain stimulation techniques: a systematic review and meta-analysis. *Rev Neurosci*. 2018; 29 (8): 883–99. DOI: 10.1515/revneuro-2017-0111. PMID: 29604209.
7. Tse NY, Goldsworthy MR, Ridding MC, Coxon JP, Fitzgerald PB, Fornito A, et al. The effect of stimulation interval on plasticity following repeated blocks of intermittent theta burst stimulation. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 8526. DOI: 10.1038/s41598-018-26791-w. PMID: 29867191.
8. Thomson AC, Sack AT. How to Design Optimal Accelerated rTMS Protocols Capable of Promoting Therapeutically Beneficial Metaplasticity. *Front Neurol*. 2020; 11: 599918. DOI: 10.3389/fneur.2020.599918. PMID: 33224103.
9. Yu F, Tang X, Hu R, Liang S, Wang W, Tian S, et al. The After-Effect of Accelerated Intermittent Theta Burst Stimulation at Different Session Intervals. *Front Neurosci*. 2020; 14: 576. DOI: 10.3389/fnins.2020.00576. Erratum in: *Front Neurosci*. 2021; 15: 687972. PMID: 32670006.
10. Gamboa OL, Antal A, Laczó B, Moliadze V, Nitsche MA, Paulus W. Impact of repetitive theta burst stimulation on motor cortex excitability. *Brain Stimul*. 2011; 4 (3): 145–51. DOI: 10.1016/j.brs.2010.09.008. PMID: 21777874.
11. Murakami T, Müller-Dahlhaus F, Lu MK, Ziemann U. Homeostatic metaplasticity of corticospinal excitatory and intracortical inhibitory neural circuits in human motor cortex. *J Physiol*. 2012; 590 (22): 5765–81. DOI: 10.1113/jphysiol.2012.238519. PMID: 22930265.
12. Bakulin I, Zabirowa A, Sinitsyn D, Poydasheva A, Lagoda D, Suponeva N, et al. Adding a Second iTBS Block in 15 or 60 Min Time Interval Does Not Increase iTBS Effects on Motor Cortex Excitability and the Responder Rates. *Brain Sci*. 2022; 12 (8): 1064. DOI: 10.3390/brainsci12081064. PMID: 36009127.
13. Vallence AM, Goldsworthy MR, Hodyl NA, Semmler JG, Pitcher JB, Ridding MC. Inter- and intra-subject variability of motor cortex plasticity following continuous theta-burst stimulation. *Neuroscience*. 2015; 304: 266–78. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.07.043. PMID: 26208843.
14. Rossi S, Hallett M, Rossini PM, Pascual-Leone A, Safety of TMS Consensus Group. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research. *Clin Neurophysiol*. 2009; 120 (12): 2008–39. DOI: 10.1016/j.clinph.2009.08.016. PMID: 19833552.
15. Rounis E, Huang YZ. Theta burst stimulation in humans: a need for better understanding effects of brain stimulation in health and disease. *Exp Brain Res*. 2020; 238 (7–8): 1707–14. DOI: 10.1007/s00221-020-05880-1. PMID: 32671422.
16. Chung SW, Rogasch NC, Hoy KE, Sullivan CM, Cash RFH, Fitzgerald PB. Impact of different intensities of intermittent theta burst stimulation on the cortical properties during TMS-EEG and working memory performance. *Hum Brain Mapp*. 2018; 39 (2): 783–802. DOI: 10.1002/hbm.23882. PMID: 29124791.
17. Mueller ST, Piper BJ. The Psychology Experiment Building Language (PEBL) and PEBL Test Battery. *J Neurosci Methods*. 2014; 222: 250–9. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2013.10.024. PMID: 24269254.
18. Haatveit BC, Sundet K, Hugdahl K, Ueland T, Melle I, Andreassen OA. The validity of d prime as a working memory index: results from the "Bergen n-back task". *J Clin Exp Neuropsychol*. 2010; 32 (8): 871–80. DOI: 10.1080/13803391003596421. PMID: 20383801.
19. Hoy KE, Bailey N, Michael M, Fitzgibbon B, Rogasch NC, Saeki T, et al. Enhancement of Working Memory and Task-Related Oscillatory Activity Following Intermittent Theta Burst Stimulation in Healthy Controls. *Cereb Cortex*. 2016; 26 (12): 4563–73. DOI: 10.1093/cercor/bhv193. PMID: 26400923.
20. Viejo-Sobera R, Redolar-Ripoll D, Boixadós M, Palaus M, Valero-Cabré A, Marron EM. Impact of Prefrontal Theta Burst Stimulation on Clinical Neuropsychological Tasks. *Front Neurosci*. 2017; 11: 462. DOI: 10.3389/fnins.2017.00462. PMID: 28867993.
21. Chung SW, Rogasch NC, Hoy KE, Fitzgerald PB. The effect of single and repeated prefrontal intermittent theta burst stimulation on cortical reactivity and working memory. *Brain Stimul*. 2018; 11 (3): 566–74. DOI: 10.1016/j.brs.2018.01.002. PMID: 29352668.
22. Perellón-Alfonso R, Kralik M, Pileckyte I, Princic M, Bon J, Matzhold C, et al. Similar effect of intermittent theta burst and sham stimulation on corticospinal excitability: A 5-day repeated sessions study. *Eur J Neurosci*. 2018; 48 (4): 1990–2000. DOI: 10.1111/ejn.14077. PMID: 30022548.
23. Boucher PO, Ozdemir RA, Momi D, Burke MJ, Jannati A, Fried PJ, et al. Sham-derived effects and the minimal reliability of theta burst stimulation. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 21170. DOI: 10.1038/s41598-021-98751-w. PMID: 34707206.
24. Wu X, Wang L, Geng Z, Wei L, Yan Y, Xie C, et al. Improved Cognitive Promotion through Accelerated Magnetic Stimulation. *eNeuro*. 2021; 8 (1): ENEURO.0392-20.2020. DOI: 10.1523/ENEURO.0392-20.2020. PMID: 33452108.
25. Wang L, Wu X, Ji GJ, Xiao G, Xu F, Yan Y, et al. Better modulation for risk decision-making after optimized magnetic stimulation. *J Neurosci Res*. 2021; 99 (3): 858–71. DOI: 10.1002/jnr.24772. PMID: 33617027.
26. Wu X, Ji GJ, Geng Z, Wang L, Yan Y, Wu Y, et al. Accelerated intermittent theta-burst stimulation broadly ameliorates symptoms and cognition in Alzheimer's disease: A randomized controlled trial. *Brain Stimul*. 2022; 15 (1): 35–45. DOI: 10.1016/j.brs.2021.11.007. PMID: 34752934.
27. Nettekoven C, Volz LJ, Kutscha M, Pool EM, Rehme AK, Eickhoff SB, et al. Dose-dependent effects of theta burst rTMS on cortical excitability and resting-state connectivity of the human motor system. *J Neurosci*. 2014; 34 (20): 6849–59. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4993-13.2014. PMID: 24828639.
28. Poydasheva AG, Bakulin IS, Sinitsyn DO, Zabirowa AH, Suponeva NA, Maslenikov NV, et al. Experience of Stanford neuromodulation therapy in patients with treatment-resistant depression. *Bulletin of RSMU*. 2022; (4): 31–7. Russian. DOI: 10.24075/brsmu.2022.044.
29. Cole EJ, Phillips AL, Bentzley BS, Stimpson KH, Nejad R, Barmak F, et al. Stanford Neuromodulation Therapy (SNT): A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Am J Psychiatry*. 2022; 179 (2): 132–41. DOI: 10.1176/appi.ajp.2021.20101429. PMID: 34711062.
30. Bakulin IS, Poydasheva AG, Zabirowa AH, Lagoda DY, Rimkevich AA, Zakharova MN, et al. Use of a metaplasticity-based protocol of therapeutic transcranial magnetic stimulation in patients with progressive multiple sclerosis and spasticity: first experience. *Neuromuscular Diseases*. 2022; 12 (3): 26–35. DOI: 10.117650/2222-8721-2022-12-3-26-35. Russian.

## ИСТОЧНИКИ И ЗНАЧИМОСТЬ ВАРИАТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛОВ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА В ИНТЕРФЕЙСЕ МОЗГ–КОМПЬЮТЕР

И. П. Ганин<sup>1</sup>✉, А. Н. Васильев<sup>1,2</sup>, Т. Д. Глазова<sup>1</sup>, А. Я. Каплан<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>2</sup> Центр нейрокognитивных исследований (МЭГ-центр), Московский государственный психолого-педагогический университет, Москва, Россия

В интерфейсе мозг–компьютер на волне P300 (ИМК-P300) выбор команд пользователя возможен за счет фокусирования им внимания на внешнем стимуле-команде и выделении из ЭЭГ реакции к этому стимулу — в виде компонентов потенциалов, связанных с событиями (ПСС). Для получения сигнала ПСС стимулы необходимо многократно повторять, однако ввиду существующей вариативности латентности реакций на отдельные стимулы усредненные ПСС могут давать искаженное представление о характере таких реакций, а также снижать точность работы интерфейса. Целью работы было разработать эффективный способ выявления эффектов вариативности латентности компонентов ПСС и учета этих эффектов в ИМК-P300, и выявить возможное влияние психофизиологических факторов на характер вариативности ПСС. Для изучения механизмов вариативности мы провели ИМК-исследование на 19 здоровых испытуемых, где использовали выделение и коррекцию латентности в пространственных компонентах N1 и P300, играющих ключевую роль в классификации команд в ИМК-P300. Этот подход обеспечил более высокую точность по сравнению с использованием обычных отведений ЭЭГ, при этом наибольший рост в 10% наблюдался при минимальном числе повторов стимулов. Также модификации интерфейса, позволяющие обеспечить более высокий уровень внимания пользователя к задаче и более четкую фиксацию взгляда на целевых объектах, способствовали повышению амплитуд компонентов ПСС посредством снижения вариативности реакций на единичные стимулы. Полученные результаты подчеркивают важную роль процессов вариативности компонентов ПСС и дают эффективный инструмент для их научного изучения, а также для разработки перспективных систем ИМК.

**Ключевые слова:** интерфейс мозг–компьютер (ИМК), электроэнцефалограмма (ЭЭГ), потенциалы, связанные с событиями, ПСС, N1, P300, вариативность ПСС

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-75-00021, <https://rscf.ru/project/21-75-00021/>

**Благодарности:** авторы благодарят Ю. Нуждина из НИЦ «Курчатовский институт» за разработку и поддержку программного обеспечения для регистрации ЭЭГ, при помощи которого проведено исследование.

**Вклад авторов:** И. П. Ганин — проведение исследования, анализ и интерпретация данных, анализ литературы, подготовка текста рукописи; А. Н. Васильев — анализ и интерпретация данных, анализ литературы, подготовка текста рукописи; Т. Д. Глазова — проведение исследования, анализ литературы; А. Я. Каплан — интерпретация данных.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом МГУ имени М. В. Ломоносова (протокол № 113-д от 19 июня 2020 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Илья Петрович Ганин  
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, к. 246, Москва, 119234, Россия; [ipganin@mail.ru](mailto:ipganin@mail.ru)

**Статья получена:** 14.04.2023 **Статья принята к печати:** 27.04.2023 **Опубликована онлайн:** 28.04.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.013

## SOURCES AND IMPACT OF HUMAN BRAIN POTENTIAL VARIABILITY IN THE BRAIN-COMPUTER INTERFACE

Ganin IP<sup>1</sup>✉, Vasilyev AN<sup>1,2</sup>, Glazova TD<sup>1</sup>, Kaplan AY<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Neurocognitive Research Center (MEG Center), Moscow State University of Psychology and Education, Moscow, Russia

In the brain-computer interface based on the P300 wave (P300 BCI), the selection of the command by the user becomes possible due to focusing the user's attention on the external stimulus/command and extraction of the response to this stimulus in the form of the event-related potential (ERP) components from EEG. To obtain the ERP signal, stimuli should be repeated many times, however, in view of the existing variability in latency of the response to certain stimuli, the averaged ERPs may give a distorted view of the nature of such responses and reduce accuracy of the interface. The study was aimed to develop an effective method for identification of the effects of the ERP components' latency variability and for accounting these effects in the P300 BCI, as well as to identify the possible impact of psychophysiological factors on the nature of ERP variability. We have conducted a BCI-based study of 19 healthy subjects involving extraction and adjustment of latency in the N1 and P300 spatial components, which play a key role in the command classification in the P300 BCI, to explore the mechanisms underlying variability. Such an approach ensured higher accuracy compared to the use of conventional EEG leads, and the highest increase of 10% was observed when using the minimum number of the stimulus repetitions. Furthermore, modifications of the interface allowing one to ensure a higher level of the user's focus on the task and a more accurate visual fixation on the target objects contributed to the increase in the amplitude of the ERP components by reducing variability of the responses to single stimuli. The findings emphasize the important role of the processes underlying the ERP components' variability and provide an effective tool for scientific exploration of such processes and the development of advanced BCI systems.

**Keywords:** brain-computer interface, BCI, electroencephalogram, EEG, event-related potentials, ERP, N1, P300, ERP variability

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation Grant № 21-75-00021, <https://rscf.ru/project/21-75-00021/>

**Acknowledgements:** the authors would like to thank Yu. Nuzhdin (Kurchatov Institute) for developing and supporting software for EEG recording used to perform the study

**Author contribution:** Ganin IP — conducting research, data analysis and interpretation, literature review, manuscript writing; Vasilyev AN — data analysis and interpretation, literature review, manuscript writing; Glazova TD — conducting research, literature review; Kaplan AY — data interpretation.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Lomonosov Moscow State University (protocol № 113-d of 19 June 2020); the informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ilya P. Ganin  
Leningradskiy Gory, 1, str. 12, k. 246, Moscow, 119234, Russia; [ipganin@mail.ru](mailto:ipganin@mail.ru)

**Received:** 14.04.2023 **Accepted:** 27.04.2023 **Published online:** 28.04.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.013

Интерфейсы мозг–компьютер (ИМК) позволяют напрямую транслировать активность мозга в команды управления компьютером и любыми другими устройствами, не задействуя мышцы и нервы, — только посредством анализа электроэнцефалограммы (ЭЭГ) пользователя [1]. Предложенная и разработанная много лет назад концепция ИМК стала междисциплинарной технологией, основным предназначением которой можно назвать помощь людям с тяжелыми нарушениями речи и движений [2], а также использование в качестве средства инструментальной диагностики или тренировки когнитивных функций [3–5].

В технологиях ИМК часто используют потенциалы, связанные с событиями (ПСС) [6]. Одна из наиболее широко применяемых и уверенно зарекомендовавших себя систем получила название ИМК-Р300 (или Р300 ВС), поскольку в основе ее работы лежит анализ связанного с вниманием компонента Р300 [7, 8]. Пользователь такого интерфейса обычно мысленно считает число подсветок нужной ему буквы или иного командного символа. ПСС на подсветки этого (целевого) объекта отличаются от ПСС на подсветки всех прочих (нецелевых) символов наличием волны Р300 [9]. По этому признаку и наличию в составе ПСС других компонентов (в первую очередь, N1) алгоритм ИМК распознает целевой символ-команду [10, 11].

Системы ИМК-Р300 востребованы для коммуникации — при наборе текстов или пошаговом управлении какими-либо устройствами [12]. Однако к их недостаткам можно отнести необходимость многократного повтора стимулов для накопления ПСС-ответов с наименьшей ошибкой, когда пользователю ИМК необходимо продолжительное время сохранять внимание на задаче. Кроме того, несмотря на предположение об идентичности мозговых реакций на многократно повторяемые стимулы, существует некоторая вариативность отдельных ответов во времени их возникновения относительно моментов стимулов [13, 14]. Этот феномен известен в рамках нейрофизиологии и в целом отражает ряд естественных мозговых процессов на разных уровнях — от клеточного до нейросетевого, в том числе определяется флуктуациями процессов восприятия внешних стимулов [15].

Известно, что наличие такой вариативности может влиять на форму получаемых усредненных ПСС, в том числе уменьшает амплитуду пиков отдельных компонентов [16]. Отсутствие учета эффектов вариативности может негативно влиять на эффективность ИМК-Р300, в основе которого лежит методика выделения ПСС, что приводит к снижению точности распознавания целевых команд [17, 18].

В целом изменение вариативности ПСС связывают с утомлением, повышенным уровнем когнитивной нагрузки, усложнением задачи пользователя [15, 19], а также с состояниями, характеризующимися снижением внимания, например при СДВГ, аутизме [20, 21]. Тем не менее, факторы, влияющие на вариативность ПСС именно в рамках ИМК-Р300 систематически не изучали ранее. Между тем, выявление режимов работы ИМК, которые благоприятно или, напротив, негативно действуют на ПСС и точность классификации команд, позволило бы разрабатывать более эффективные системы, которые обеспечат более надежное управление, особенно если речь идет о потенциальных пользователях со сниженным уровнем внимания.

Представляется так же целесообразным учет вариативности ПСС в ИМК-Р300 путем модификации алгоритмов классификации команд, что может быть особенно важно при относительно небольшом числе

накопления стимулов в этом интерфейсе, когда эффекты вариативности могут не компенсироваться количеством усреднений. Ввиду различного вклада компонентов ПСС в классификацию и их варьирующей топографии у разных пользователей [22] эффективным подходом может быть выделение независимых пространственных компонентов для анализа и учета их вариативности по отдельности.

Целью работы было выявить возможные факторы стимульной среды и режимы работы ИМК-Р300, влияющие на степень вариативности ПСС, а также разработать и апробировать более эффективные подходы независимого учета вариативности отдельных компонентов ПСС при классификации.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 19 здоровых испытуемых (5 мужчин и 14 женщин) в возрасте 18–23 лет. Критерии включения: здоровые добровольцы мужского и женского пола в возрасте 18–35 лет. Критерии исключения: наличие диагностированных неврологических и/или психических заболеваний, эпизодов судорожных припадков или диагностированного эпилептического статуса.

Во время эксперимента испытуемый располагался в кресле перед монитором, на котором осуществляли предъявление стандартной матрицы ИМК-Р300 размером  $6 \times 6$  с буквами русского алфавита и цифрами. Угловой размер матрицы составлял  $18^\circ \times 18^\circ$ , размер ячеек —  $1,7^\circ$ , расстояние между ячейками —  $1,1^\circ$ . Цвет фона экрана и ячеек — черный (RGB 0,0,0), цвет рамки вокруг ячейки и символа внутри нее — серый (RGB 89,90,97). Стимулами служили подсветки (изменение цвета фона с черного на серый, а цвета буквы — с серого на черный) строк и столбцов матрицы в случайном порядке. Длительность стимулов и межстимульных интервалов — 97 и 48,5 мс соответственно (16 и 8 кадров при частоте обновления экрана 165 Гц). Стимуляцию осуществляли в виде стимульных последовательностей, каждая из которых включала предъявление всех возможных 12 стимулов в матрице (шесть строк и шесть столбцов).

Отдельный режим эксперимента включал 15 блоков, в каждом из которых целевой назначалась одна из ячеек матрицы (указывалась в начале блока многократным подмигиванием). В каждом блоке предъявлялось пять стимульных последовательностей, что соответствовало 60 стимулам (10 целевых и 50 нецелевых). Один режим, таким образом, включал 150 целевых и 750 нецелевых стимулов.

Для изучения влияния различных факторов на вариативность ПСС использовали несколько режимов, отличающихся параметрами стимульной среды и задачей испытуемого. В режиме пассивного внимания испытуемый не должен был активно считать подсветки целевого стимула, как в ИМК-Р300, а просто фиксировал взгляд на целевой ячейке. Для усложнения задачи использовали режимы с перемешиванием букв: при каждой целевой подсветке символы во всех ячейках матрицы менялись местами случайным образом. Для создания дополнительной когнитивной нагрузки в ряде режимов с перемешиванием испытуемых просили считать не просто все целевые подсветки, а число согласных букв в целевой ячейке при смене символа. Для облегчения фиксации взгляда на ячейке и уменьшения влияния дистракторов в режимах с «полупустой» матрицей символы не были видны постоянно, а появлялись только во время подсветки (рис. 1).

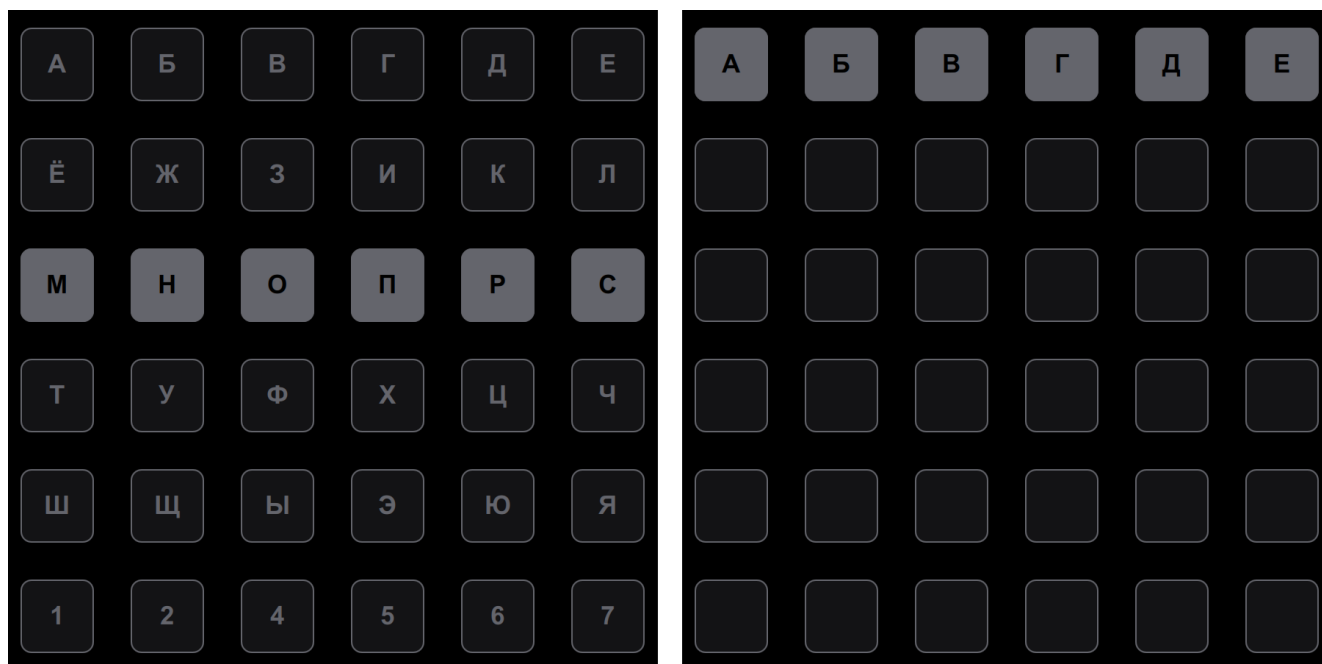


Рис. 1. Стимульная матрица ИМК-Р300, используемая в работе. Матрица располагалась в центре экрана на черном фоне. Слева показана «обычная матрица», справа — «полупустая матрица»

Ниже перечислены режимы с кратким указанием инструкций испытуемому:

- 1) обычная матрица, пассивное внимание («просто смотреть на целевую ячейку»);
- 2) обычная матрица, активное внимание («считать количество подсветок целевой ячейки»);
- 3) полупустая матрица, активное внимание («считать количество подсветок целевой ячейки»);
- 4) полупустая матрица, перемешивание, активное внимание («считать количество подсветок целевой ячейки»);
- 5) полупустая матрица, перемешивание, когнитивная нагрузка («считать количество согласных в целевой ячейке»);
- 6) обычная матрица, перемешивание, активное внимание («считать количество подсветок целевой ячейки»);
- 7) обычная матрица, перемешивание, когнитивная нагрузка («считать количество согласных в целевой ячейке»).

Все режимы чередовались в псевдослучайном порядке, за исключением режима с пассивным вниманием, который всегда следовал первым ввиду особой инструкции.

ЭЭГ регистрировали с помощью усилителя NVX52 (МКС, Зеленоград; Россия) в 30 отведениях: Fp1, Fp2, F7, F3, Fz, F4, F8, FC5, FC1, FC2, FC6, T7, C3, Cz, C4, T8, CP5, CP1, CP2, CP6, P7, P3, Pz, P4, P8, PO7, POz, PO8, O1, O2 с объединенным референтом TP9 + TP10. Частота дискретизации сигнала — 1000 Гц. Для синхронизации ЭЭГ с моментами подсветок использовали миниатюрный фотодатчик, закрепленный в левом верхнем углу экрана. Регистрацию сигналов и управление ходом эксперимента осуществляли в оригинальной программной среде Resonance, написанной на языке C++ (<http://resonance.bcilab.net/documentation>).

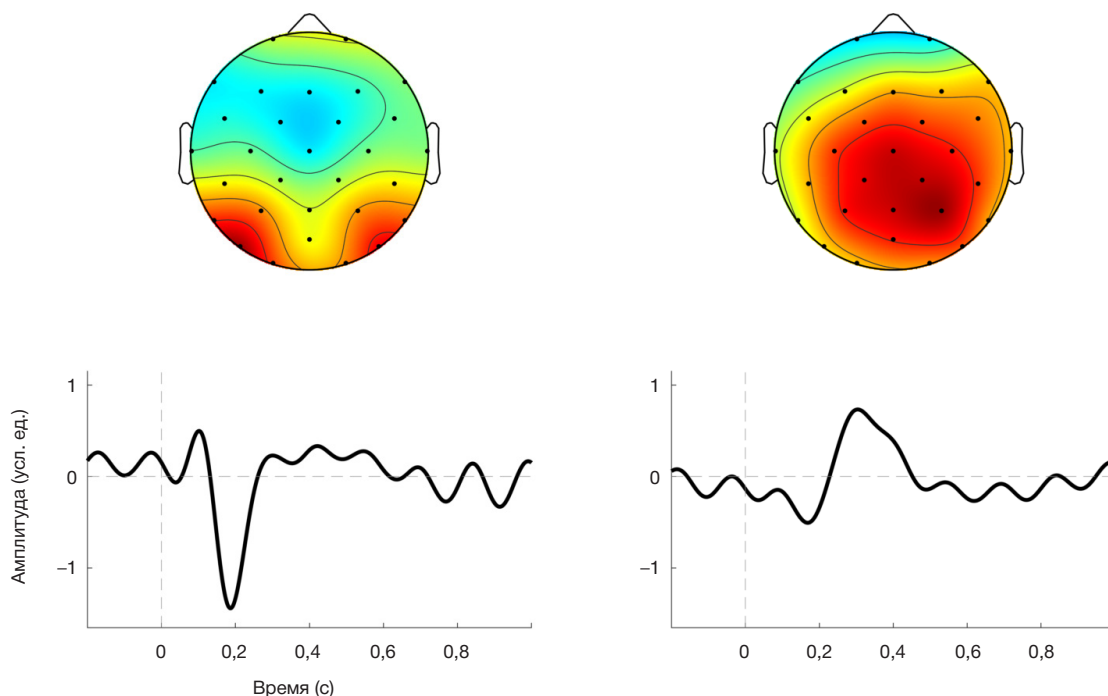
Обработку сигнала ЭЭГ и классификацию производили в среде MATLAB 9.13 (R2022b) (MathWorks; США). Сигнал ЭЭГ подвергали полосной фильтрации в диапазоне 1–10 Гц фильтром с конечной импульсной характеристикой без фазового сдвига. Далее методом независимых компонент (ICA) удалялись окулографические артефакты. После этого непрерывный сигнал разбивали на эпохи

с границами [–400 1200] мс относительно моментов предъявления стимулов.

Следующим этапом анализа было получение пространственных фильтров, выделяющих из многоканального ЭЭГ-сигнала интересующие нас компоненты (N1 и P300). Для этого у каждого испытуемого выделяли эпохи в окрестностях индивидуальных пиков на ПСС, после чего вычисляли оптимальные пространственные проекции (пространственные фильтры) по критерию Фишера [23]. Данный метод позволяет снизить размерность ЭЭГ-сигнала, повысить отношение сигнал/шум для изучаемых компонентов и в большой степени изолировать два компонента друг от друга для независимого их изучения [23]. Описываемый далее анализ проводили для сигналов этих двух выделенных пространственных компонентов (один для N1 и один для P300). Сигналы компонентов нормировали на стандартное отклонение всех нецелевых эпох у каждого испытуемого (далее — «усл. ед.» вместо мкВ).

Для каждого режима у испытуемого формировался набор целевых и нецелевых эпох для каждого компонента — N1 и P300. Для получения усредненных классическим способом ПСС все эпохи одного испытуемого усредняли для каждого режима отдельно для класса целевых и нецелевых в наборах N1 и P300. Амплитуду этих компонентов рассчитывали как минимальное/максимальное значение сигнала в окнах [100 350] и [200 500] мс соответственно, а латентности пиков определяли как время максимума или минимума относительно начала стимула.

Кроме этого, для анализа вариативности ПСС латентности компонентов N1 и P300 рассчитывали в отдельных неусредненных целевых эпохах как локальный минимум или максимум в тех же временных окнах, что и для ПСС. Амплитуда компонента была равна значению сигнала для найденных в этой эпохе латентностей. Для оценки вариативности латентностей пиков ПСС рассчитывали среднее абсолютное отклонение (mean absolute deviation, MAD) в каждом режиме у каждого испытуемого, а для



**Рис. 2.** Выделенные пространственные компоненты N1 и P300. Сверху показана топография паттернов пространственных фильтров. Снизу — усредненные по всем испытуемым компоненты N1 и P300. По вертикали — нормализованная амплитуда в условных единицах, по горизонтали — время (с). Вертикальная пунктирная линия (0 с) соответствует времени подачи стимула. N = 19 испытуемых

оценки влияния вариативности на амплитуду ПСС перед усреднением эпохи сдвигали по времени на величину разности средней латентности и латентности компонента в конкретной эпохе.

Для оценки эффектов вариативности ПСС на эффективность распознавания команд в ИМК рассчитывали точность классификации в следующих вариантах: для обычных ЭЭГ-каналов (стандартный подход) и для выделенных пространственных компонентов N1 и P300. Причем для последнего варианта классификацию вычисляли как без выравнивания по латентности пиков, так и с выравниванием — с коррекцией только для N1 либо только для P300, а также с коррекцией для обоих пиков N1 и P300. В качестве признаков для линейного дискриминанта Фишера использовали значения амплитуд сигнала в окне [0 600] мс (каждая 10-я точка) в 11 каналах ЭЭГ-отведений Cz, CP1, CP2, P3, Pz, P4, PO7, POz, PO8, O1, O2 или в двух каналах для N1 и P300 соответствующих пространственных компонентов. Точность классификации оценивали методом кросс-валидации при последовательном тестировании на данных одного блока (все эпохи, относящиеся к одной целевой ячейке) классификатора, обученного на остальных 14 блоках. Точность классификации определяли как долю верно распознанных букв (из 15). Причем при тестировании рассчитывали точность для разного числа стимульных последовательностей — от одного до пяти. Такой расчет точности производили для каждого режима, испытуемого и способа формирования признаков сигнала.

Статистический анализ проводили в MATLAB с использованием обобщенных линейных моделей со смешанными эффектами. В качестве случайного фактора использовали один постоянный коэффициент для переменной «испытуемый», а экспериментальные условия («активное внимание», «когнитивная нагрузка», «полупустая матрица», «перемешивание элементов») и режимы коррекции латентности служили фиксированными эффектами. Значимость фиксированных эффектов

оценивали с помощью F-теста. Исследовали следующие зависимые переменные: амплитуду, латентность, MAD латентностей N1 и P300, а также точность классификации. Для точности классификации использовали биномиальную регрессию, а для остальных показателей — линейную.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2 представлены выделенные пространственные компоненты N1 и P300 и соответствующие им паттерны (топографическое распределение весовых коэффициентов). Компонент N1 со средней латентностью 187 мс имел типичную латерально-затылочную локализацию, а P300 с латентностью 315 мс — центрально-теменную локализацию.

В табл. 1 приведены усредненные по группе значения амплитуды компонентов N1 и P300 в каждом из режимов — как до коррекции латентностей в индивидуальных эпохах, так и после коррекции. Амплитуды N1 и P300 в усредненных ПСС увеличивались после коррекции:  $F(1,258) = 581,24$ ;  $p = 0,00000$ . Фактор наличия активного внимания оказался значим для амплитуды N1, которая увеличивалась по сравнению с пассивным вниманием к стимулу (режим 1):  $F(1,36) = 17,87$ ;  $p = 0,00015$ . Амплитуда N1 увеличивалась для фактора «полупустая матрица»:  $F(1,110) = 16,10$ ;  $p = 0,00011$  и «когнитивная нагрузка»:  $F(1,110) = 48,49$ ;  $p = 0,00000$ . Амплитуда P300 увеличивалась для фактора «когнитивная нагрузка»:  $F(1,110) = 18,01$ ;  $p = 0,00005$  и уменьшалась для фактора «перемешивание»:  $F(1,110) = 4,72$ ;  $p = 0,032$ .

Средние латентности компонентов N1 и P300, а также показатель вариативности латентности (MAD) представлены в табл. 2. Латентности N1 и P300 уменьшались для фактора «полупустая матрица»:  $F(1,110) = 45,87$ ,  $p = 0,00000$  и  $F(1,110) = 24,51$ ,  $p = 0,00000$  соответственно. Латентность N1 увеличивалась также для фактора «перемешивание»:  $F(1,110) = 5,17$ ;  $p = 0,025$ . Наличие активного внимания приводило к снижению показателя MAD компонента N1 по сравнению с режимом пассивного внимания:

**Таблица 1.** Средние значения амплитуд компонентов N1 и P300 во всех режимах при стандартном способе усреднения (без коррекции латентности) и при усреднении эпох, скорректированных по латентности соответствующего компонента. Представлены среднее и стандартная ошибка среднего. N = 19 испытуемых

Компонент	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4	Режим 5	Режим 6	Режим 7
Амплитуда без коррекции латентности, усл. ед.							
N1	-1,17 ± 0,11	-1,38 ± 0,08	-1,53 ± 0,09	-1,50 ± 0,08	-1,81 ± 0,09	-1,29 ± 0,09	-1,67 ± 0,11
P300	0,92 ± 0,07	1 ± 0,06	0,94 ± 0,07	0,86 ± 0,06	1,07 ± 0,08	0,89 ± 0,06	1,05 ± 0,05
Амплитуда с коррекцией латентности, усл. ед.							
N1	-1,50 ± 0,09	-1,67 ± 0,08	-1,81 ± 0,07	-1,77 ± 0,07	-2,05 ± 0,09	-1,59 ± 0,07	-1,93 ± 0,09
P300	1,47 ± 0,06	1,59 ± 0,04	1,52 ± 0,06	1,46 ± 0,04	1,62 ± 0,07	1,53 ± 0,04	1,67 ± 0,04

$F(1,36) = 1,60$ ;  $p = 0,0016$ . Показатель MAD для N1 уменьшался для фактора «полупустая матрица»:  $F(1,110) = 12,43$ ;  $p = 0,00061$  и «когнитивная нагрузка»:  $F(1,110) = 11,56$ ;  $p = 0,00094$ . Для P300 наблюдали увеличение MAD для фактора «перемешивание»:  $F(1,110) = 4,80$ ;  $p = 0,03056$ .

В табл. 3 представлены результаты средней точности классификации во всех режимах при использовании разных способов формирования признаков сигнала: каналы ЭЭГ-отведений и каналы для N1 и P300 соответствующих пространственных компонентов, для которых производили или не производили коррекцию латентности. Данные в таблице приведены для минимального числа (1 и 2) стимульных последовательностей на каждую букву, когда точность еще низкая и различия между режимами выше. Для фактора «когнитивная нагрузка» выявлена тенденция к увеличению точности:  $F(1,108) = 3,39$ ;  $p = 0,068$ .

На рис. 3 представлена средняя точность классификации для разных способов формирования признаков сигнала и разного числа стимульных последовательностей. При использовании пространственных фильтров (только двух векторов данных — для N1 и P300) без коррекции латентности точность была наименьшей и была даже ниже, чем при использовании обычных 11 отведений ЭЭГ:  $F(1,3284) = 5,99$ ,  $p = 0,014$ . Коррекция латентности только для пространственного компонента N1 давала более высокую точность, но она не отличалась значимо от варианта с обычными отведениями ЭЭГ:  $F(1,3284) = 1,1771$ ,  $p = 0,28$ . В то же время коррекция латентности только для пространственного компонента P300 приводила к более высокой точности по сравнению с обычными отведениями ЭЭГ:  $F(1,3284) = 24,51$ ,  $p = 0,00000$ . Наиболее высокие значения точности классификации отмечены при совместной коррекции латентности для N1 и P300 (в каждом из двух соответствующих пространственных компонентов). Точность в этом случае была выше, чем при использовании обычных отведений ЭЭГ:  $F(1,3284) = 24,29$ ,  $p = 0,00000$ , и выше, чем при коррекции только на латентность P300:  $F(1,3284) = 4,34$ ,  $p = 0,037$  (в последнем случае различия были для 2-й и 3-й стимульных последовательностей:  $p < 0,05$ ).

**Таблица 2.** Средние значения абсолютных латентностей и показателя их вариативности (MAD) для компонентов N1 и P300 во всех режимах. Представлены среднее и стандартная ошибка среднего. N = 19 испытуемых

Компонент	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4	Режим 5	Режим 6	Режим 7
Латентность, мс							
N1	187 ± 3,25	187 ± 2,6	184 ± 2,3	185 ± 2,2	185 ± 2,1	191 ± 2,6	191 ± 2,7
P300	323 ± 10,5	320 ± 9,3	303 ± 10,6	302 ± 10,4	305 ± 11,6	316 ± 10,3	325 ± 10,8
Среднее абсолютное отклонение латентности (MAD), мс							
N1	21,1 ± 1,5	18,9 ± 1,4	16,3 ± 1,2	18,0 ± 1,1	15,1 ± 0,8	19,2 ± 1,6	17,5 ± 1,5
P300	42,5 ± 2,2	41,3 ± 2,2	43,2 ± 2,7	44,9 ± 2,6	43,0 ± 2,4	44,0 ± 2,5	44,9 ± 2,7

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем исследовании был предложен эффективный подход к анализу вариативности ПСС в технологии ИМК-P300, который позволил выявить ряд факторов, влияющих на характеристики ПСС, а также изучить вклад эффектов вариативности в точность распознавания команд в этом интерфейсе.

Для анализа эффектов вариативности латентности ПСС необходимо детектировать компоненты в единичных (неусредненных) эпохах. Ввиду наличия шума как техногенного, так и физиологического характера процесс этот весьма сложен, поэтому крайне важно максимально использовать всю полезную информацию в сигнале ЭЭГ. Несмотря на то что в некоторых работах эффекты вариативности изучали в рамках ИМК-P300, влияние этих эффектов оценивали в обычных каналах ЭЭГ и применяли только к одному компоненту P300 [17, 24]. В нашей предыдущей работе мы использовали коррекцию латентности двух компонентов — N1 и P300, однако каждый из них анализировали в своем наборе каналов [18]. Более эффективным подходом может быть использование объединенной информации от всех каналов с одновременным анализом нескольких компонентов во всех из них. Например, независимые компоненты, выделенные с помощью ICA, уже использовали авторы работ по изучению вариативности (вне ИМК), однако они анализировали лишь один ранний компонент ПСС [21, 25]. Кроме того, метод ICA не гарантирует выделения интересующих для анализа компонентов. В настоящей работе мы предложили использование пространственных фильтров для выделения двух компонентов — N1 и P300, функционально значимых для ИМК-P300, с последующим анализом эффектов вариативности в них, а не в отдельных каналах ЭЭГ. Несмотря на то что данный метод использовали ранее [23], в том исследовании он служил дополнительным этапом предобработки и выделения признаков сигнала для классификации в ИМК, но никак не был связан с изучением эффектов вариативности ПСС. Выделение пространственных компонентов с целью их независимой коррекции ранее не применялось.

**Таблица 3.** Средние значения абсолютных латентностей и показателя их вариативности (MAD) для компонентов N1 и P300 во всех режимах. Представлены среднее и стандартная ошибка среднего. N = 19 испытуемых

Способ выделения признаков сигнала	Режим 1	Режим 2	Режим 3	Режим 4	Режим 5	Режим 6	Режим 7
Точность при одной стимульной последовательности, %							
Отведения ЭЭГ	66,7 ± 5,4	75,3 ± 4,6	77,29 ± 3,7	74,4 ± 4,0	84,2 ± 3,0	68,4 ± 4,6	80,7 ± 3,1
Простр. комп.	56,4 ± 5,8	63,5 ± 4,2	68,8 ± 3,7	62,8 ± 3,2	76,8 ± 2,8	59,7 ± 3,7	73,0 ± 3,3
Простр. комп. + корр. N1 + P300	76,8 ± 3,4	81,8 ± 2,9	86,3 ± 3,0	85,3 ± 2,6	86,7 ± 2,9	76,1 ± 2,5	84,9 ± 2,2
Точность при двух стимульных последовательностях, %							
Отведения ЭЭГ	83,9 ± 4,1	90,0 ± 2,1	94,7 ± 1,4	94,0 ± 1,7	96,8 ± 1,3	88,8 ± 4,1	92,3 ± 2,1
Простр. комп.	75,8 ± 4,9	86,6 ± 3,3	86,3 ± 2,8	88,8 ± 2,0	93,3 ± 1,9	82,8 ± 4,0	93,0 ± 1,2
Простр. комп. + корр. N1 + P300	94,0 ± 1,2	97,1 ± 1,0	97,5 ± 1,6	93,3 ± 1,8	97,9 ± 1,0	95,4 ± 1,5	96,8 ± 1,5

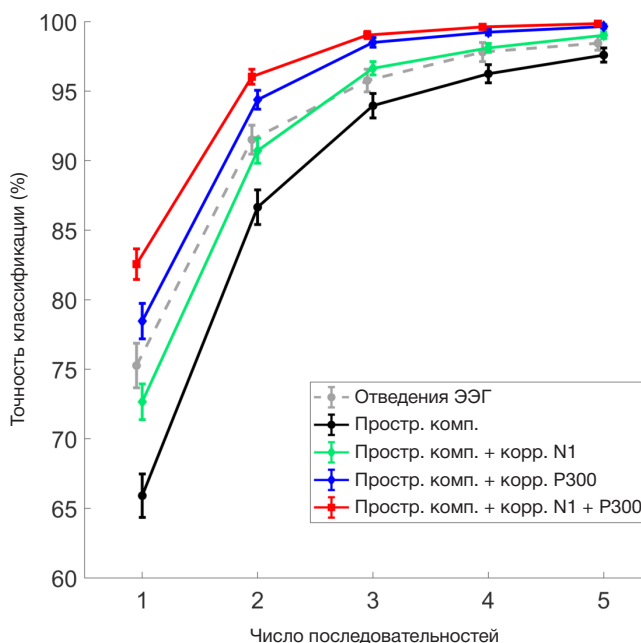
Также использование подхода с пространственными компонентами уменьшает вероятность ошибочной детекции пиков в единичных эпохах по сравнению с использованием сигнала в отдельных ЭЭГ-отведениях, что делает анализ вариативности более объективным.

Существенной частью работы было выявление возможных факторов, влияющих на характеристики ПСС в ИМК-Р300. Наличие активного внимания (инструкции эмоционального счета подсветок) вело к росту амплитуды компонента N1, причем механизм такого увеличения, предположительно, включает уменьшение вариативности латентности реакций на отдельные стимулы, поскольку показатель MAD при этом снижался. Ранее в нашей группе уже было показано увеличение амплитуды компонентов ПСС для такой инструкции по сравнению с пассивным вниманием к стимулам в ИМК-Р300 [26]. По-видимому, инструкция активного счета стимулов улучшает фиксацию взгляда на целевой позиции в матрице, что важно для компонента N1 [27]. Отсутствие символов во всех ячейках матрицы, по-видимому, также положительно влияет на фиксацию взгляда на целевой ячейке, поскольку в режиме «полупустая матрица» амплитуда N1 увеличивалась с одновременным уменьшением его вариативности. Это согласуется с противоположными эффектами для компонента N1 в условиях, где слежение за целевыми объектами осложнено подвижностью их позиций [18], а также подтверждает взаимосвязь между особенностями работы глазодвигательной системы и вариативностью компонентов ПСС [28].

Постоянная смена символов в ячейках матрицы, вероятно, негативно влияет на внимание к целевому стимулу, о чем говорит уменьшение амплитуды P300 и увеличение его вариативности, а также увеличение латентности N1. Неблагоприятное влияние подобных манипуляций со стимульной средой на ИМК-Р300 подтверждается также тем, что испытуемые сообщали о сложностях с выполнением инструкции в режимах с перемешиванием. В то же время интересным и не вполне очевидным результатом является то, что дополнительная когнитивная нагрузка в режимах с перемешиванием элементов (счет согласных при смене букв), напротив, приводила к росту амплитуд N1 и P300, причем для N1 этот эффект был, по крайней мере, отчасти обусловлен снижением вариативности. Известно, что эффекты вариативности единичных ответов усиливаются, когда внимание субъекта распределяется между двумя конкурирующими задачами [29]. Вероятно, в нашей работе когнитивная нагрузка, интегрированная в задачу слежения за целевыми событиями, вызывала, напротив, увеличение

внимания, и потому подобные модификации стимульной среды могут быть перспективными для ИМК-Р300.

Потенциальную эффективность использования в ИМК факторов, позитивно влияющих на внимание, подтверждает и тенденция к повышению точности классификации целевых стимулов в режимах с когнитивной нагрузкой (табл. 3). Предложенный в нашей работе метод коррекции вариативности не в обычных отведениях ЭЭГ, а в выделенных пространственных компонентах N1 и P300, обеспечил наиболее высокие результаты точности классификации (рис. 2). При этом наибольший прирост точности наблюдался при наименьшем числе стимульных последовательностей (94% против 84%), что подчеркивает ценность этого метода для режимов работы ИМК-Р300, обеспечивающих наибольшую скорость выбора команд, и превосходит результаты в работах, где также использовалось выделение пространственных компонентов, но без учета эффектов вариативности [23, 30]. Обращает на себя внимание тот факт, что вклад компонентов N1 и P300 в эффективность классификации не равнозначен: нескорректированный



**Рис. 3.** Средние значения точности классификации во всех режимах для одной и двух стимульных последовательностей, рассчитанные для разных наборов признаков сигнала, которые использовались классификатором — обычные 11 отведений ЭЭГ и выделенные пространственные компоненты N1 и P300 с коррекцией и без коррекции латентностей пиков. Представлены среднее и стандартная ошибка среднего. N = 19 испытуемых

N1 дает больший вклад, чем нескорректированный P300. Однако ввиду большей вариативности P300 коррекция его латентности приводила к значительному увеличению точности, превышавшей как коррекцию только N1, так и использование стандартных отведений ЭЭГ.

Ограничением использованного нами подхода пока является то, что в данной работе мы не корректировали латентность в нецелевых эпохах. В перспективе для реализации онлайн-режима ИМК необходимо будет разработать алгоритм, который, к примеру, позволит избегать коррекции малоамплитудных пиков нецелевых эпох.

## ВЫВОДЫ

Предложен подход к анализу вариативности латентностей ПСС в выделенных пространственных компонентах ЭЭГ.

Использование этого метода в ИМК-P300 позволило добиться более высоких результатов точности классификации команд по сравнению с существующими методами. Кроме того, применение подобного подхода выявило ряд факторов стимульной среды и режимов работы ИМК-P300, влияющих на эффекты вариативности ПСС, а именно, модификации интерфейса, влияющие на уровень внимания пользователя, в том числе сопутствующая основной задаче когнитивная нагрузка, а также упрощающие фиксацию взгляда на целевых объектах, позитивно влияли на амплитуду ПСС и снижение вариативности единичных реакций на стимулы. Полученные результаты дополняют существующие знания о механизмах вариативности латентностей ПСС и дают новые основания для разработки более эффективных систем ИМК.

## Литература

- Mridha MF, Das SC, Kabir MM, Lima AA, Islam MR, Watanobe Y. Brain-Computer Interface: Advancement and Challenges. *Sensors (Basel)*. 2021; 21 (17): 5746.
- Orban M, Elsamanty M, Guo K, Zhang S, Yang H. A Review of Brain Activity and EEG-Based Brain-Computer Interfaces for Rehabilitation Application. *Bioengineering (Basel)*. 2022; 9 (12): 768.
- Carelli L, Solca F, Faini A, Meriggi P, Sangalli D, Cipresso P, Riva G, Ticozzi N, Ciammola A, Silani V, Poletti B. Brain-Computer Interface for Clinical Purposes: Cognitive Assessment and Rehabilitation. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 1695290.
- Ганин И. П., Косиченко Е. А., Соколов А. В., Иоаннисянц О. М., Арефьев И. М., Басова А. Я., и др. Адаптация технологии интерфейсов мозг-компьютер на волне P300 для оценивания состояния больных нервной анорексией. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2019; 2: 36–43.
- Eldeeb S, Susam BT, Akcakaya M, Conner CM, White SW, Mazefsky CA. Trial by trial EEG based BCI for distress versus non distress classification in individuals with ASD. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 6000.
- Abiri R, Borhani S, Sellers EW, Jiang Y, Zhao X. A comprehensive review of EEG-based brain-computer interface paradigms. *J Neural Eng*. 2019; 16 (1): 011001.
- Luck SJ. *An introduction to the event related potential technique*. MIT Press, Cambridge, MA; 2005.
- Pan J, Chen X, Ban N, He J, Chen J, Huang H. Advances in P300 brain-computer interface spellers: toward paradigm design and performance evaluation. *Front Hum Neurosci*. 2022; 16: 1077717.
- Farwell LA, Donchin E. Talking off the top of your head: toward a mental prosthesis utilizing event-related brain potentials. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1988; 70: 510–523.
- Krusiński DJ, Sellers EW, McFarland DJ, Vaughan TM, Wolpaw JR. Toward enhanced P300 speller performance. *J Neurosci Methods*. 2008; 167 (1): 15–21.
- Rezeika A, Benda M, Stawicki P, Gemblar F, Saboor A, Volosyak I. Brain-Computer Interface Spellings: A Review. *Brain Sciences*. 2018; 8 (4): 57.
- Allison BZ, Kübler A, Jin J. 30+ years of P300 brain-computer interfaces. *Psychophysiology*. 2020; 57 (7): e13569.
- Makeig S, Onton J. ERP features and EEG dynamics: an ICA perspective. *Oxford handbook of event-related potential components*. Oxford University Press, New York; 2011.
- Dowdall JR, Luczak A, Tata MS. Temporal variability of the N2pc during efficient and inefficient visual search. *Neuropsychologia*. 2012; 50 (10): 2442–53.
- Dinstein I, Heeger DJ, Behrmann M. Neural variability: friend or foe? *Trends Cogn. Sci*. 2015; 19 (6): 322–328.
- Ouyang G, Hildebrandt A, Sommer W, Zhou C. Exploiting the intra-subject latency variability from single-trial event-related potentials in the P3 time range: A review and comparative evaluation of methods. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 2017; 75: 1–21.
- Aricò P, Aloise F, Schettini F, Salinari S, Mattia D, Cincotti F. Influence of P300 latency jitter on event related potential-based brain-computer interface performance. *Journal of neural engineering*. 2014; 11 (3): 035008.
- Ганин И. П., Каплан А. Я. Изучение эффектов вариативности потенциалов мозга человека в интерфейсе мозг-компьютер на волне P300. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2022; 3: 78–85.
- Yagi Y, Coburn KL, Estes KM, Arruda JE. Effects of aerobic exercise and gender on visual and auditory P300, reaction time, and accuracy. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1999; 80 (5): 402–8.
- Kovarski K, Malvy J, Khanna RK, Arsène S, Batty M, Latinus M. Reduced visual evoked potential amplitude in autism spectrum disorder, a variability effect? *Translational Psychiatry*. 2019; 9 (1): 1–9.
- Gonen-Yaacovi G, Arazi A, Shahar N, Karmo A, Haar S, Meiran N, Dinstein I. Increased ongoing neural variability in ADHD. *Cortex*. 2016; 81: 50–63.
- Tou SLJ, Warschausky SA, Karlsson P, Huggins JE. Individualized Electrode Subset Improves the Calibration Accuracy of an EEG P300-design Brain-Computer Interface for People with Severe Cerebral Palsy. *bioRxiv*. 2023: 533775.
- Pires F, Nunes U, Castelo-Branco M. Statistical spatial filtering for a P300-based BCI: tests in able-bodied, and patients with cerebral palsy and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroscience methods*. 2011; 195 (2): 270–281.
- Thompson DE, Warschausky S, Huggins JE. Classifier-based latency estimation: a novel way to estimate and predict BCI accuracy. *Journal of neural engineering*. 2013; 10 (1): 016006.
- Milne E. Increased intra-participant variability in children with autistic spectrum disorders: evidence from single-trial analysis of evoked EEG. *Front Psychol*. 2011; 2: 51.
- Басюл И. А., Каплан А. Я. Изменения N200 и P300 компонентов потенциалов, связанных с событиями, при варьировании условий внимания в системе Brain Computer Interface. *Журнал высшей нервной деятельности им. ИП Павлова*. 2014; 64 (2): 159–65.
- Hillyard SA, Vogel EK, Luck SJ. Sensory gain control (amplification) as a mechanism of selective attention: electrophysiological and neuroimaging evidence. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci*. 1998; 353 (1373): 1257–70.
- Zhang B, Stevenson SS, Cheng H, Laron M, Kumar G, Tong J, et al. Effects of fixation instability on multifocal VEP (mfVEP) responses in amblyopes. *Journal of Vision*. 2008; 8 (3): 16.



29. Polich J. Updating P300: an integrative theory of P3a and P3b. *Clin. Neurophysiol.* 2007; 118 (10): 2128–48.
30. Zhang Y, Zhou G, Zhao Q, Jin J, Wang X, Cichocki A. Spatial-Temporal Discriminant Analysis for ERP-Based Brain-Computer Interface. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering.* 2013; 21 (2): 233–43.

## References

1. Mridha MF, Das SC, Kabir MM, Lima AA, Islam MR, Watanobe Y. Brain-Computer Interface: Advancement and Challenges. *Sensors (Basel).* 2021; 21 (17): 5746.
2. Orban M, Elsamanty M, Guo K, Zhang S, Yang H. A Review of Brain Activity and EEG-Based Brain-Computer Interfaces for Rehabilitation Application. *Bioengineering (Basel).* 2022; 9 (12): 768.
3. Carelli L, Solca F, Faini A, Meriggi P, Sangalli D, Cipresso P, Riva G, Ticozzi N, Ciammola A, Silani V, Poletti B. Brain-Computer Interface for Clinical Purposes: Cognitive Assessment and Rehabilitation. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 1695290.
4. Ganin IP, Kosichenko EA, Sokolov AV, Ioannisyanc OM, Arefev IM, Basova AY, Kaplan AY. Adaptation of the p300-based brain-computer interface for anorexia nervosa patients state evaluation. *Bulletin of RSMU.* 2019; 2: 32–38.
5. Eldeeb S, Susam BT, Akcakaya M, Conner CM, White SW, Mazefsky CA. Trial by trial EEG based BCI for distress versus non distress classification in individuals with ASD. *Sci Rep.* 2021; 11 (1): 6000.
6. Abiri R, Borhani S, Sellers EW, Jiang Y, Zhao X. A comprehensive review of EEG-based brain-computer interface paradigms. *J Neural Eng.* 2019; 16 (1): 011001.
7. Luck SJ. An introduction to the event related potential technique. MIT Press, Cambridge, MA; 2005.
8. Pan J, Chen X, Ban N, He J, Chen J, Huang H. Advances in P300 brain-computer interface spellers: toward paradigm design and performance evaluation. *Front Hum Neurosci.* 2022; 16: 1077717.
9. Farwell LA, Donchin E. Talking off the top of your head: toward a mental prosthesis utilizing event-related brain potentials. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 1988; 70: 510–523.
10. Krusienski DJ, Sellers EW, McFarland DJ, Vaughan TM, Wolpaw JR. Toward enhanced P300 speller performance. *J Neurosci Methods.* 2008; 167 (1): 15–21.
11. Rezeika A, Benda M, Stawicki P, Gemblar F, Saboor A, Volosyak I. Brain-Computer Interface Spellers: A Review. *Brain Sciences.* 2018; 8 (4): 57.
12. Allison BZ, Kübler A, Jin J. 30+ years of P300 brain-computer interfaces. *Psychophysiology.* 2020; 57 (7): e13569.
13. Makeig S, Onton J. ERP features and EEG dynamics: an ICA perspective. *Oxford handbook of event-related potential components.* Oxford University Press, New York; 2011.
14. Dowdall JR, Luczak A, Tata MS. Temporal variability of the N2pc during efficient and inefficient visual search. *Neuropsychologia.* 2012; 50 (10): 2442–53.
15. Dinstein I, Heeger DJ, Behrmann M. Neural variability: friend or foe? *Trends Cogn. Sci.* 2015; 19 (6): 322–328.
16. Ouyang G, Hildebrandt A, Sommer W, Zhou C. Exploiting the intra-subject latency variability from single-trial event-related potentials in the P3 time range: A review and comparative evaluation of methods. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017; 75: 1–21.
17. Aricò P, Aloise F, Schettini F, Salinari S, Mattia D, Cincotti F. Influence of P300 latency jitter on event related potential-based brain-computer interface performance. *Journal of neural engineering.* 2014; 11 (3): 035008.
18. Ganin IP, Kaplan AY. Study of the human brain potentials variability effects in P300 based brain-computer interface. *Bulletin of RSMU.* 2022; 3: 78–85.
19. Yagi Y, Coburn KL, Estes KM, Arruda JE. Effects of aerobic exercise and gender on visual and auditory P300, reaction time, and accuracy. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999; 80 (5): 402–8.
20. Kovarski K, Malvy J, Khanna RK, Arsène S, Batty M, Latinus M. Reduced visual evoked potential amplitude in autism spectrum disorder, a variability effect? *Translational Psychiatry.* 2019; 9 (1): 1–9.
21. Gonen-Yaacovi G, Arazi A, Shahar N, Karmo A, Haar S, Meiran N, Dinstein I. Increased ongoing neural variability in ADHD. *Cortex.* 2016; 81: 50–63.
22. Tou SLJ, Warschausky SA, Karlsson P, Huggins JE. Individualized Electrode Subset Improves the Calibration Accuracy of an EEG P300-design Brain-Computer Interface for People with Severe Cerebral Palsy. *bioRxiv.* 2023: 533775.
23. Pires G, Nunes U, Castelo-Branco M. Statistical spatial filtering for a P300-based BCI: tests in able-bodied, and patients with cerebral palsy and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuroscience methods.* 2011; 195 (2): 270–281.
24. Thompson DE, Warschausky S, Huggins JE. Classifier-based latency estimation: a novel way to estimate and predict BCI accuracy. *Journal of neural engineering.* 2013; 10 (1): 016006.
25. Milne E. Increased intra-participant variability in children with autistic spectrum disorders: evidence from single-trial analysis of evoked EEG. *Front Psychol.* 2011; 2: 51.
26. Basyul IA, Kaplan AY. Izmneneniya N200 i P300 komponentov potencialov, svyazannyx s sobyitiami, pri var'irovanii uslovij vnimaniya v sisteme Brain Computer Interface. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. IP Pavlova.* 2014; 64 (2): 159–65. Russia.
27. Hillyard SA, Vogel EK, Luck SJ. Sensory gain control (amplification) as a mechanism of selective attention: electrophysiological and neuroimaging evidence. *Philos Trans R Soc L. B Biol Sci.* 1998; 353 (1373): 1257–70.
28. Zhang B, Stevenson SS, Cheng H, Laron M, Kumar G, Tong J, et al. Effects of fixation instability on multifocal VEP (mfVEP) responses in amblyopes. *Journal of Vision.* 2008; 8 (3): 16.
29. Polich J. Updating P300: an integrative theory of P3a and P3b. *Clin. Neurophysiol.* 2007; 118 (10): 2128–48.
30. Zhang Y, Zhou G, Zhao Q, Jin J, Wang X, Cichocki A. Spatial-Temporal Discriminant Analysis for ERP-Based Brain-Computer Interface. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering.* 2013; 21 (2): 233–43.

## ОДНОМОМЕНТНОЕ ЭНДОВИТРЕАЛЬНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ОТСЛОЙКИ СЕТЧАТКИ, ОСЛОЖНЕННОЙ МАКУЛЯРНЫМ РАЗРЫВОМ С КРАТКОВРЕМЕННОЙ ТАМПОНАДОЙ ПЕРФТОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЕМ

Х. П. Тахчиди, Н. Х. Тахчиди, Н. А. Махно ✉

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

Регматогенная отслойка сетчатки, осложненная макулярным разрывом, является редкой и наиболее трудной патологией в плане витреоретинальной хирургии, а успешный анатомический результат не всегда сопровождается высокими зрительными функциями. На сегодняшний день наиболее эффективным методом хирургического лечения данной патологии принято считать витрэктомию с закрытием макулярного разрыва аутоплазмой крови с повышенным содержанием тромбоцитов, блокированием периферических разрывов и последующей тампонадой витреальной полости заместителями стекловидного тела. При всей вариативности хирургических подходов к лечению регматогенной отслойки сетчатки, осложненной сквозным макулярным разрывом, остается актуальным поиск безопасной и эффективной хирургической технологии, позволяющей при минимальном повреждении ретинальных структур достичь высоких морфо-функциональных результатов и минимизировать при этом срок реабилитации пациента. Представленный клинический случай демонстрирует возможность одномоментного микрохирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки, осложненной сквозным макулярным разрывом с применением аутологичной кондиционированной плазмы в комбинации с кратковременной тампонадой перфторорганическим соединением. Результаты использования данной технологии показали ее надежность и высокую эффективность, а также обеспечили высокий морфо-функциональный результат в послеоперационном периоде — восстановление макулярной архитектоники, закрытие макулярного разрыва, анатомическое прилегание сетчатки и улучшение зрительных функций.

**Ключевые слова:** регматогенная отслойка сетчатки, макулярный разрыв, аутологичная кондиционированная плазма, витреоретинальная хирургия, перфторорганическое соединение

**Вклад авторов:** Х. П. Тахчиди — концепция и дизайн исследования, хирургическое лечение пациента, редактирование текста; Н. Х. Тахчиди — анализ литературных данных; Н. А. Махно — сбор и обработка материала, написание текста.

**Соблюдение этических стандартов:** от пациента получено добровольное информированное согласие на хирургическое лечение и обработку персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Надежда Александровна Махно  
Волоколамское шоссе, д. 30/2, г. Москва, 123182, Россия; nadezda.mahno7@gmail.com

**Статья получена:** 27.03.2023 **Статья принята к печати:** 21.04.2023 **Опубликована онлайн:** 28.04.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.016

## SINGLE-STAGE ENDOVITREAL SURGERY OF RETINAL DETACHMENT COMPLICATED BY MACULAR HOLE INVOLVING THE SHORT-TERM PERFLUOROCARBON TAMPONADE

Takhchidi KhP, Takhchidi NKh, Mahno NA ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Rhegmatogenous retinal detachment complicated by macular hole is a rare disorder that is the most challenging in terms of vitreoretinal surgery, and good anatomical outcome is not always associated with high visual functions. Today, vitrectomy, involving macular hole closure with autologous platelet-rich plasma, sealing peripheral retinal tears, and subsequent vitreal cavity tamponade with vitreous substitutes, is considered to be the most effective method for surgical treatment of this disorder. Despite variability of surgical approaches to treatment of rhegmatogenous retinal detachment complicated by macular holes, the search for safe and effective surgical technique, allowing one to achieve beneficial morphological and functional outcome with minimal damage to the retinal structures and to minimize the patient's rehabilitation period, is still relevant. The clinical case reported demonstrates the possibility of performing single-stage endovitreal treatment of retinal detachment complicated by macular hole using the autologous conditioned plasma in combination with the short-term perfluorocarbon tamponade. The results of using this technique show its reliability and superior efficiency and ensure good morphological and functional outcome in the postoperative period: restored macular architectonics, macular hole closure, anatomic retinal adhesion, and improved visual functions.

**Keywords:** rhegmatogenous retinal detachment, macular hole, autologous conditioned plasma, vitreoretinal surgery, perfluorocarbon

**Author contribution:** Takhchidi KhP — study concept and design, surgical treatment of the patient, manuscript editing; Takhchidi NKh — literature review; Mahno NA — data acquisition and processing, manuscript writing.

**Compliance with ethical standards:** the patient submitted the informed consent to surgery and personal data processing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nadezhda A. Mahno  
Volokolamskoe shosse, 30/2, Moscow, 123182, Russia; nadezda.mahno7@gmail.com

**Received:** 27.03.2023 **Accepted:** 21.04.2023 **Published online:** 28.04.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.016

Регматогенная отслойка сетчатки, осложненная макулярным разрывом, — редкое патологическое состояние, одно из наиболее трудных заболеваний в плане витреоретинальной хирургии на сегодняшний день, успешный анатомический результат которой не всегда обеспечивает высокие зрительные функции.

По данным литературы, распространенность регматогенной отслойки сетчатки, осложненной макулярным разрывом, составляет 2,3–4% случаев.

Данная патология встречается преимущественно у лиц с миопией высокой степени и периферическими разрывами на сетчатке [1]. Реже макулярный разрыв может возникать вторично по отношению к отслойке сетчатки как следствие витреоретинальной тракции после задней отслойки стекловидного тела, травмы глаза, тангенциальной тракции, вызванной эпиретинальным фиброзом, или пролиферативной витреоретинопатии [1, 2].

До конца XX в. основной целью лечения регматогенной отслойки сетчатки, осложненной макулярным разрывом, было достижение анатомического прилегания сетчатки путем блокирования периферических разрывов без каких-либо попыток закрытия макулярного дефекта, что приводило к низким функциональным результатам и формированию центральной скотомы [3, 4].

В литературе описаны клинические случаи, когда хирургическое лечение комбинации данных патологий проводят в два этапа. После восстановления анатомического прилегания сетчатки через некоторое время выполняют второй этап операции, направленный на блокирование макулярного разрыва. Однако такой подход не всегда обеспечивает восстановление макулярной архитектоники, требует больших материальных затрат и не всегда гарантирует получение высоких зрительных и морфологических результатов [5, 6].

На сегодняшний день единственным эффективным методом хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки, осложненной сквозным макулярным разрывом, позволяющим достичь высоких анатомических и функциональных результатов, принято считать трехпортовую витрэктомия через плоскую часть цилиарного тела с удалением задних слоев стекловидного тела, закрытием макулярного разрыва, блокированием периферических разрывов с последующей тампонадой витреальной полости заместителями стекловидного тела (силиконовое масло различной степени вязкости, газо-воздушная смесь с длительным периодом рассасывания, стерильный воздух) [1, 5, 7–9].

С целью повышения эффективности хирургического лечения макулярного разрыва, а именно увеличения процента анатомического блокирования макулярного разрыва и улучшения зрительных функций, предложены различные методики хирургического закрытия макулярного дефекта: механическое сближение краев разрыва, проведение пилинга внутренней пограничной мембраны (ВПМ), блокирование макулярного разрыва инвертированным лоскутом ВПМ в различных модификациях, амниотической мембраной, трансплантация передней капсулы хрусталика, сохранение ВПМ [1, 7–11].

В последние годы большой интерес вызывают методы, связанные с блокированием макулярного разрыва аутоплазмой крови с повышенным содержанием тромбоцитов. В настоящее время в лечении патологии сетчатки активно применяют две методики получения плазмы: PRP (от *англ.* platelet-rich plasma) — богатая тромбоцитами плазма крови, обладающая более высокой концентрацией тромбоцитов (в 3–4 раза больше от первоначального содержания крови) и АСР (от *англ.* autologous conditioned plasma) — аутологичная кондиционированная плазма, практически лишенная лейкоцитов и содержащая повышенную концентрацию тромбоцитов (в 2–3 раза больше от первоначального содержания крови). Локальное использование аутологичных факторов в хирургии макулярной патологии позволяет получить хороший анатомо-функциональный результат и минимизировать травматизацию ретикулярной ткани в ходе операции [12–15].

При всей вариативности хирургических подходов к лечению регматогенной отслойки сетчатки, осложненной сквозным макулярным разрывом, остается актуальным поиск безопасной и эффективной хирургической технологии, позволяющей при минимальном повреждении

ретикулярных структур достичь анатомического прилегания сетчатки и восстановления архитектоники макулярной области, а также минимизировать срок реабилитации пациента.

Представленный клинический случай демонстрирует одномоментный подход в лечении регматогенной отслойки сетчатки, осложненной сквозным макулярным разрывом.

Целью работы было оценить эффективность и безопасность использования одномоментного подхода в эндовитреальном лечении регматогенной отслойки сетчатки, осложненной сквозным макулярным разрывом при помощи блокады периферического разрыва эндолазеркоагуляцией, соединения макулярного разрыва аутологичной кондиционированной плазмой и кратковременной тампонадой витреальной полости перфторорганическим соединением (ПФОС).

### Описание клинического случая

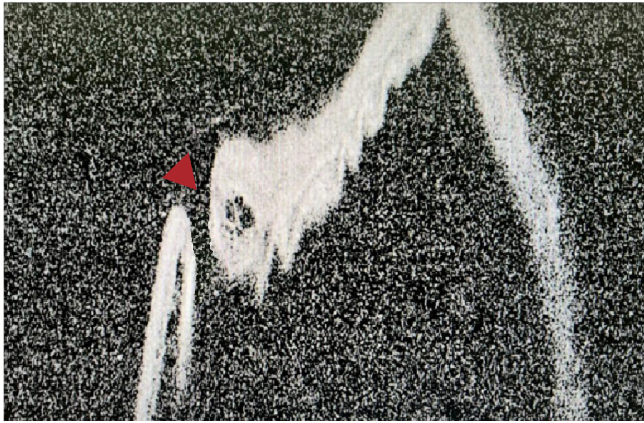
В июле 2022 г. в Научно-исследовательский центр офтальмологии РНИМУ им. Н. И. Пирогова обратилась пациентка А. 60 лет с жалобами на резкое снижение остроты зрения левого глаза и появление темной завесы в периферическом поле зрения левого глаза сверху, с носовой и височной сторон. Вышеперечисленные жалобы возникли резко за 5 дней до обращения. Из анамнеза известно, что в 2015 г. на оба глаза (ОУ) было проведено оперативное лечение — фактоэмульсификация катаракты с имплантацией интраокулярной линзы (ИОЛ).

Пациентке провели предоперационное комплексное офтальмологическое обследование, включающее стандартные методы: визометрию с определением некорригированной остроты зрения (НКОЗ) и максимально корригированной остроты зрения (МКОЗ), пневмотонометрию, биомикроофтальмоскопию с помощью бесконтактной линзы MaxField (Ocular Inc.; США) и специальные методы исследования: ультразвуковое исследование (УЗИ) глазного яблока в В-режиме на приборе Compact Touch NEW (Quantel Medical; Франция) и спектральную оптическую когерентную томографию (СОКТ) на приборе Spectralis HRA+OCT («Spectralis HRA+OCT», Heidelberg Engineering, Module, OCT-2 85 000 Hz Inc., Германия).

В ходе первичного обследования острота зрения левого глаза (ОС) составляла 0,01 н/к (эксцентрично), внутриглазное давление (ВГД) — 15 мм рт. ст. Проведение биомикроофтальмоскопии ОС показало, что передний отрезок без патологических изменений, ИОЛ в капсульном мешке, центрирована. Отслойка сетчатки обнаружена с 12 до 8 ч с захватом макулярной области, на периферии на 1 ч визуализирован клапанный разрыв, в макулярной зоне — округлый красный дефект. По данным УЗИ выявлена высокая субтотальная отслойка сетчатки высотой до 9,13 мм с клапанным разрывом в верхне-наружном квадранте. По данным СОКТ макулярной области отслойка сетчатки обнаружена в центральной области, сквозной дефект всех ретикулярных слоев диаметром 380 мкм — в области фовеа (рис. 1).

На основании комплексного офтальмологического обследования пациентке с учетом ее жалоб и анамнеза был установлен диагноз: ОС Субтотальная регматогенная отслойка сетчатки. Сквозной макулярный разрыв. Артифакция.

Пациентке была проведена трехпортовая витрэктомия через плоскую часть цилиарного тела с использованием



**Рис. 1.** Спектральная оптическая когерентная томография макулярной области (до оперативного лечения). Отслойка сетчатки. Макулярный разрыв (красная стрелка) диаметром 380 мкм

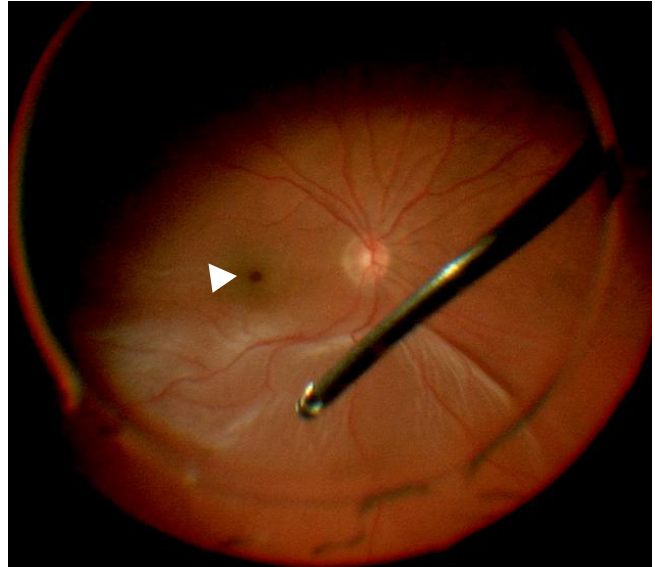
разового набора инструментов калибра 27 G по стандартной методике с частотой резов до 5500 об./мин, вакуум до 650 мм рт. ст. (рис. 2). После предварительного контрастирования триамцинолоном ацетонидом выполнили индукцию с последующим удалением задней гиаловидной мембраны и прилежащих задних слоев стекловидного тела. При осмотре периферических отделов был визуализирован на 1 ч клапанный разрыв сетчатки. С целью уменьшения подвижности и расправления отслоенной сетчатки в витреальную полость вводили дозированно ПФОС, в результате чего была достигнута адаптация отслоенной сетчатки к подлежащим оболочкам с дренированием субретинальной жидкости через разрыв в витреальную полость. При помощи активной экстррузии выполнили частичную аспирацию ПФОС. С целью выявления ВГМ макулярную область сетчатки окрашивали интравитреальным красителем «Membrane Blue-Dual», при этом зона макулярного разрыва была прикрыта каплей ПФОС, позволяющей предотвратить попадание красителя под сетчатку. После аспирации интравитреального красителя и оставшегося объема ПФОС ВГМ удалили с помощью эндовитреального пинцета на 360 ° вокруг фовеолы в пределах сосудистых аркад.

Витреальную полость вновь тампонировали ПФОС, остаточную субретинальную жидкость аспирировали над зоной разрыва. Проводили эндолазеркоагуляцию клапанного разрыва на 1 ч.

При помощи активной экстррузии выполняли частичную аспирацию ПФОС с заменой на сбалансированный солевой раствор (BSS), при этом оставляя его в объеме 3–4 диаметра диска зрительного нерва над областью макулярного разрыва. С помощью экструживной канюли края макулярного разрыва сближали к центру до полного их соприкосновения (без касания кончика канюли ретинальной ткани), при этом аспирируя оставшуюся субретинальную жидкость.

Аутологичную кондиционированную плазму (АКП) готовили интраоперационно при помощи запатентованного двойного шприца Arthrex ACP (РУ № ФЗН 2012/12123 от 08.11.2016) путем забора 15 мл венозной крови пациента с помощью иглы-бабочки 18–20 G без использования антикоагулянта в шприц Arthrex ACP. После забора крови шприц устанавливали в центрифугу ROTOFIX 32A (Hettich; Германия) с последующим центрифугированием в течение 5 мин со скоростью 1700 об./мин.

После аспирации оставшейся части ПФОС на область макулярного разрыва с помощью шприца с тупой



**Рис. 2.** Интраоперационное фото глазного дна: в центральной зоне сетчатки заметен макулярный разрыв (белая стрелка). Отслойка сетчатки в верхнем, темпоральном и нижнем квадрантах.

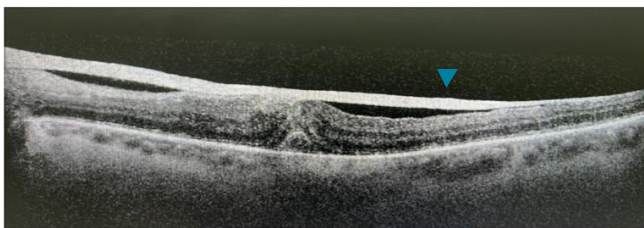
иглой провели дозированную капельную многослойную последовательную аппликацию АКП экспозицией до 1 мин в объеме 0,1 мл до появления тусклой полупрозрачной пленки в пределах сосудистых аркад. Операцию завершили кратковременной тампонадой витреальной полости ПФОС в течение 8 дней с целью формирования хориоретинальной спайки в области периферического разрыва и удержания аппликата АКП в зоне макулы для формирования склейки макулярного разрыва с последующей ее регенерацией.

В послеоперационном периоде проводили стандартную медикаментозную терапию (антибактериальную и противовоспалительную).

На первые сутки после оперативного лечения пациентка субъективно отметила улучшение остроты зрения левого глаза и отсутствие темной завесы в периферическом поле зрения перед левым глазом, предъявляла жалобы на метаморфопсии. При обследовании НКОЗ составила 0,05; МКОЗ — 0,16. ВГД — 18 мм рт. ст. По данным офтальмоскопии в макулярной области в пределах сосудистых аркад визуализировалась полупрозрачная фибриновая пленка, на периферии на 1 ч разрыв заблокирован отечными лазерными коагулятами, сетчатка адаптирована на всем протяжении. По данным СОКТ макулярной области, края макулярного разрыва сомкнуты, на поверхности сетчатки визуализируется фибриновая пленка (рис. 3).

В течение 7 дней в послеоперационном периоде по данным СОКТ обнаружены лизис фибриновой пленки, формирование макулярного профиля, полное закрытие макулярного разрыва.

На 8-е сутки был проведен второй этап оперативного лечения с использованием разового набора инструментов калибра 27 G. Путем активной аспирации проводили удаление ПФОС. По аналогии с вышеописанной технологией готовили интраоперационно АКП и наносили на поверхность сетчатки макулярной области дозированную капельную многослойную последовательную аппликацию АКП экспозицией до 1 мин в объеме 0,1 мл до появления тусклой полупрозрачной пленки в пределах сосудистых аркад. Операцию завершили заменой ранее введенного BSS на воздух сначала путем активной аспирации раствора, затем остаточный слой жидкости,



**Рис. 3.** Спектральная оптическая когерентная томография макулярной области (1 сутки после оперативного лечения). Макулярный разрыв закрыт, на поверхности сетчатки визуализируется гиперрефлективная структура — фибриновая пленка (синяя стрелка)

соответствующий 2–3 диаметрам макулы, аспирировали пассивно с помощью канюли. После удаления портов на склеростомы наложили швы.

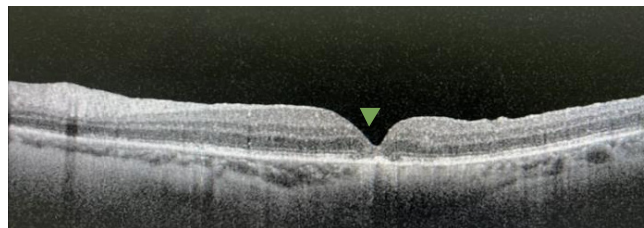
Через месяц после оперативного лечения пациентка субъективно отметила повышение остроты зрения OS, жалобы на метаморфопсии уменьшились. При обследовании НКОЗ составила 0,16; МКОЗ — 0,3, ВГД — 16 мм рт. ст. По данным офтальмоскопии в макулярной области отсутствует ретиальный дефект, на периферии на 1 ч разрыв заблокирован пигментированными лазерными коагулятами, сетчатка прилежит на всем протяжении. По данным микропериметрии (MAIA, CenterVue Inc.; Италия) среднее значение центральной светочувствительности (СЧ) сетчатки составляет OS — 24,7 дБ, точка фиксации стабильная. По данным СОКТ макулярной области, произошло формирование правильного фовеолярного профиля, макулярный разрыв сомкнут, частично восстановлена сегментация сетчатки (рис. 4).

На контрольном осмотре через 3 месяца после проведенного лечения пациентка субъективно отмечала улучшение остроты зрения левого глаза, жалоб на метаморфопсии не предъявляла. По данным осмотра наблюдалось увеличение остроты зрения: НКОЗ составила 0,2, МКОЗ — 0,5, ВГД — 17 мм рт. ст. По данным офтальмоскопии, в макулярной области рефлекс сглажен, на периферии на 1 ч разрыв заблокирован пигментированными лазерными коагулятами, сетчатка прилежит на всем протяжении. Среднее значение центральной СЧ сетчатки OS увеличилось до 25,3 дБ, точка фиксации оставалась стабильной. По данным СОКТ макулярной области визуализируется правильный профиль макулярной области, частичное восстановление наружных слоев сетчатки.

На осмотре через 6 месяцев после оперативного лечения пациентка активно жалоб не предъявляла. По данным осмотра острота зрения оставалась стабильной: НКОЗ — 0,2, МКОЗ — 0,5, ВГД — 15 мм рт. ст. По данным офтальмоскопии в макулярной области рефлекс сглажен, сетчатка прилежит на всем протяжении, на периферии на 1 ч разрыв заблокирован пигментированными лазерными коагулятами. По данным микропериметрии наблюдалось увеличение среднего значения центральной СЧ сетчатки OS — 26,1 дБ, точка фиксации стабильная. По данным СОКТ макулярный профиль сохранен, частично восстановлена сегментация наружных слоев сетчатки (рис. 5).

### Обсуждение клинического случая

При сочетании ретинальной отслойки сетчатки и сквозного макулярного разрыва прогноз успешного исхода по морфо-функциональным показателям снижается, а во время операции хирургу приходится выполнять ряд дополнительных интраоперационных манипуляций,

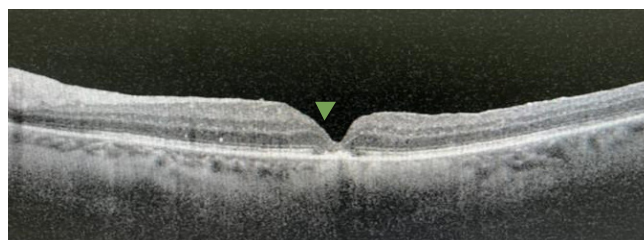


**Рис. 4.** Спектральная оптическая когерентная томография макулярной области (1 месяц после оперативного лечения). Макулярный профиль выражен (зеленая стрелка). Визуализируются комплекс «пигментный эпителий — мембрана Бруха», прерывистая наружная пограничная мембрана

увеличивающих риск интра- и послеоперационных осложнений. В настоящее время остается актуальной проблема выбора эффективного и безопасного хирургического метода лечения ретинальной отслойки сетчатки, осложненной макулярным разрывом.

По данным литературы, большинство представленных хирургических техник лечения комбинации данных патологий заканчиваются эндовитреальной тампонадой силиконовым маслом с последующим его удалением через 3–6 месяцев [1, 7, 8, 11, 16] или газо-воздушной смесью [5, 17]. Однако силиконовое масло не обладает способностью плотно прижимать сетчатку заднего полюса глаза. Известно, что между силиконовым маслом и сетчаткой находится слой внутриглазной жидкости, поэтому для склеивания и регенерации макулярного разрыва условия не оптимальны (в сравнении с тампонадой ПФОС). Кроме того, длительное нахождение силиконового масла в витреальной полости может повлечь за собой развитие таких осложнений, как вторичная офтальмогипертензия, помутнение хрусталика, контактная кератопатия, перисиликоновая пролиферация, кистозный макулярный отек. К тому же, силиконовое масло индуцирует развитие гиперметропии высокой степени и неправильного астигматизма, что значительно снижает качество остроты зрения на весь период тампонады [18]. Тампонада витреальной полости газо-воздушной смесью требует соблюдения длительного вынужденного положения пациента лицом вниз, снижает качество его жизни в период тампонады, ограничивает возможность офтальмокопического контроля в послеоперационном периоде за адаптацией сетчатки и закрытием макулярного разрыва, а также способствует развитию катаракты, формированию ретиальной складчатости и периферических ретиальных разрывов.

Представленное в данной работе применение в качестве кратковременной тампонады витреальной полости ПФОС обеспечивает надежную адаптацию сетчатки к подлежащим тканям, способствует формированию прочной хориоретинальной спайки и предупреждает смещение сетчатки относительно подлежащих оболочек.



**Рис. 5.** Спектральная оптическая когерентная томография макулярной области (6 месяцев после оперативного лечения). Макулярный профиль выражен (зеленая стрелка). Визуализируется комплекс «пигментный эпителий — мембрана Бруха». Частичное восстановление сегментации наружных слоев сетчатки — прерывистая наружная пограничная мембрана, частичное восстановление зоны фоторецепторов сетчатки

Тампонада ПФОС обеспечивает стабильное удержание фибриновой пленки и плотную адгезию фибрина к ретинальному дефекту, что уменьшает риск смещения фибриновой пленки относительно макулярного разрыва и способствует надежному склеиванию и эффективной регенерации макулярного дефекта. Применение данного заместителя стекловидного тела не требует соблюдения особого вынужденного положения и не ограничивает мобильность пациента в раннем послеоперационном периоде. За короткое время тампонады витреальной полости ПФОС не развиваются осложнения.

Возможность применения АКП (под прикрытием тампонады ПФОС) позволяет максимально использовать ее репаративный и регенеративный потенциал. Это обеспечивает оптимальное восстановление морфологии макулярной области и позволяет получить высокие зрительные функции.

В результате предложенного микрохирургического подхода в лечении регматогенной отслойки сетчатки, осложненной макулярным разрывом, получены полное

анатомическое прилегание сетчатки, восстановление макулярной архитектоники сетчатки и улучшение зрительных функций.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенная технология микрохирургического эндовитреального лечения регматогенной отслойки сетчатки, осложненной сквозным макулярным разрывом с применением эндолазеркоагуляции, аутологичной кондиционированной плазмы и кратковременной тампонады витреальной полости ПФОС продемонстрировала надежность и высокую эффективность, а также обеспечила высокий морфо-функциональный результат в послеоперационном периоде, а именно восстановление макулярной архитектоники, закрытие макулярного разрыва, анатомическое прилегание сетчатки и улучшение зрительных функций. Для более глубокого анализа необходимо дальнейшее исследование предложенной технологии.

#### Литература

1. Stappler T, Montesel A, Konstantinidis L, Wolfensberger TJ, Eandi CM. Inverted internal limiting membrane flap technique for macular hole coexistent with rhegmatogenous retinal detachment. *Retina*. 2022; 42 (8): 1491–7.
2. Cunningham MA, Tarantola RM, Folk JC, Sohn EH, Boldt HC, Graff JA et al. Proliferative vitreoretinopathy may be a risk factor in combined macular hole retinal detachment cases. *Retina*. 2013; 33 (3): 579–85.
3. Chignell AH, Billington B. The treatment of macular holes by pars plana vitrectomy and internal air/SF6 exchange. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1986; 224 (1): 67–68.
4. Gonvers M, Macherer R. A new approach to treating retinal detachment with macular hole. *Am J Ophthalmol*. 1982; 94 (4): 468–72.
5. Singh AJ. Combined or sequential surgery for management of rhegmatogenous retinal detachment with macular holes. *Retina*. 2009; 29 (8): 1106–10.
6. Балашевич Л. И., Платов Е. А., Нигматов Б. Ф. Случай хирургического лечения регматогенной отслойки сетчатки с макулярным разрывом. В сборнике: Проблемы современной медицины: актуальные вопросы. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции; 6 ноября 2014 г.; Красноярск; 37–39.
7. Zhao PP, Wang S, Liu N, Shu ZM, Zhao JS. A review of surgical outcomes and advances for macular holes. *J Ophthalmol*. 2018; 1–10.
8. Abouhoussein MA, Elbaha SM, Aboushousha M. Human amniotic membrane plug for macular holes coexisting with rhegmatogenous retinal detachment. *Clin Ophthalmol*. 2020; 14: 2411–6.
9. Shukla D, Kalliath J, Srinivasan K, Neelakantan N, Rajendran A, Naresh KB, et al. Management of rhegmatogenous retinal detachment with coexisting macular hole: a comparison of vitrectomy with and without internal limiting membrane peeling. *Retina*. 2013; 33 (3): 571–78.
10. Ryan EH Jr, Bramante CT, Mittra RA, Dev S, Bennett SR, Williams DF, et al. Management of rhegmatogenous retinal detachment with coexistent macular hole in the era of internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol*. 2011; 152 (5): 815–9.
11. Liu X, Huang J, Zhou R, Jiang Z, Chen H, Chen W, et al. Comparison of internal limiting membrane peeling with the inverted internal limiting membrane flap technique for rhegmatogenous retinal detachment coexisting with macular hole. *Retina*. 2022; 42 (4): 697–703.
12. Крупина Е. А. Хирургическое лечение идиопатического макулярного разрыва с применением богатой тромбоцитами плазмы крови [диссертация]. М., 2019.
13. Попов Е. М., Куликов А. Н., Чурашов С. В., Гаврилюк И. О., Егорова Е. Н., Аббасова А. И. Сравнение показателей получаемой разными способами аутоплазмы, используемой для лечения пациентов с макулярным разрывом. *Офтальмологические ведомости*. 2021; 14 (4): 27–34.
14. Арсютов Д. Г. Использование аутологичной кондиционированной плазмы, обогащенной тромбоцитами, в хирургии регматогенной отслойки сетчатки с центральными и периферическими разрывами. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4 (4): 61–65. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.4.8.
15. Байбородов Я. В., Жоголев К. С. Аутологичная кондиционированная плазма — индуцированная фибриновая пленка в хирургическом лечении макулярных разрывов. *Современные технологии в офтальмологии*. 2020; 4: 283.
16. Хурдаева А. Г., Захаров В. Д., Шкворченко Д. О., Крупина Е. А., Норман К. С., Юхананова А. В. Хирургическое лечение регматогенной отслойки сетчатки, осложненной макулярным разрывом, с применением богатой тромбоцитами плазмы крови и локальным окрашиванием внутренней пограничной мембраны. *Современные технологии в офтальмологии*. 2019; 4 (29): 267–70.
17. O'Driscoll AM, Goble RR, Kirkby GR. Vitrectomy for retinal detachments with both peripheral retinal breaks and macular holes. An assessment of outcome and the status of the macular hole. *Retina*. 2001; 21 (3): 221–5.
18. Тахчиди Х. П., Метаев С. А., Глинчук Н. Я., Газаль Н. А. Обоснование раннего удаления силиконового масла при лечении тяжелых отслоек сетчатки различного генеза. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2004; 5: 60–65.

#### References

1. Stappler T, Montesel A, Konstantinidis L, Wolfensberger TJ, Eandi CM. Inverted internal limiting membrane flap technique for macular hole coexistent with rhegmatogenous retinal detachment. *Retina*. 2022; 42 (8): 1491–7.

2. Cunningham MA, Tarantola RM, Folk JC, Sohn EH, Boldt HC, Graff JA et al. Proliferative vitreoretinopathy may be a risk factor in combined macular hole retinal detachment cases. *Retina*. 2013; 33 (3): 579–85.
3. Chignell AH, Billington B. The treatment of macular holes by pars plana vitrectomy and internal air/SF6 exchange. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1986; 224 (1): 67–68.
4. Gonvers M, Machemer R. A new approach to treating retinal detachment with macular hole. *Am J Ophthalmol*. 1982; 94 (4): 468–72.
5. Singh AJ. Combined or sequential surgery for management of rhegmatogenous retinal detachment with macular holes. *Retina*. 2009; 29 (8): 1106–10.
6. Balashevich LI, Platov EA, Nigmatov BF. Sluchaj xirurgicheskogo lecheniya regmatogennoj otslojki setchatki s makulyarnym razryvom. V sbornike: Problemy sovremennoj mediciny: aktual'nye voprosy. Sbornik nauchnyx trudov po itogam mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii; 6 noyabrya 2014 g; Krasnoyarsk; 37–39. Russian.
7. Zhao PP, Wang S, Liu N, Shu ZM, Zhao JS. A review of surgical outcomes and advances for macular holes. *J Ophthalmol*. 2018; 1–10.
8. Abouhusein MA, Elbaha SM, Aboushousha M. Human amniotic membrane plug for macular holes coexisting with rhegmatogenous retinal detachment. *Clin Ophthalmol*. 2020; 14: 2411–6.
9. Shukla D, Kalliath J, Srinivasan K, Neelakantan N, Rajendran A, Naresh KB, et al. Management of rhegmatogenous retinal detachment with coexisting macular hole: a comparison of vitrectomy with and without internal limiting membrane peeling. *Retina*. 2013; 33 (3): 571–78.
10. Ryan EH Jr, Bramante CT, Mitra RA, Dev S, Bennett SR, Williams DF, et al. Management of rhegmatogenous retinal detachment with coexistent macular hole in the era of internal limiting membrane peeling. *Am J Ophthalmol*. 2011; 152 (5): 815–9.
11. Liu X, Huang J, Zhou R, Jiang Z, Chen H, Chen W, et al. Comparison of internal limiting membrane peeling with the inverted internal limiting membrane flap technique for rhegmatogenous retinal detachment coexisting with macular hole. *Retina*. 2022; 42 (4): 697–703.
12. Krupina EA. Xirurgicheskoe lechenie idiopatsicheskogo makulyarnogo razryva s primeneniem bogatoj trombocitami plazmy krovi [dissertaciya]. M., 2019. Russian.
13. Popov EM, Kulikov AN, Churashov SV, Gavriyuk IO, Egorova EN, Abbasova AI. Sravnenie pokazatelej poluchaemoj raznymi sposobami autoplazmy, ispol'zujemoj dlya lecheniya pacientov s makulyarnym razryvom. *Oftal'mologicheskie vedomosti*. 2021; 14 (4): 27–34. Russian.
14. Arsyutov DG. Ispol'zovanie autologichnoj kondicionirovannoj plazmy, obogashhennoj trombocitami, v xirurgii regmatogennoj otslojki setchatki s central'nym i perifericheskimi razryvami. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4 (4): 61–65. DOI: 10.29413/ABS.2019-4.4.8. Russian.
15. Bajborodov YaV, Zhogolev KS. Autologichnaya kondicionirovannaya plazma — inducirovannaya fibrinnaya plenka v xirurgicheskom lechenii makulyarnyx razryvov. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2020; 4: 283. Russian.
16. Xurdaeva AG, Zaxarov VD, Shkvorchenko DO, Krupina EA, Norman KS, Yuxananova AV. Xirurgicheskoe lechenie regmatogennoj otslojki setchatki, oslozhennoj makulyarnym razryvom, s primeneniem bogatoj trombocitami plazmy krovi i lokal'nym okrashivaniem vnutrennej pograničnoj membrany. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2019; 4 (29): 267–70. Russian.
17. O'Driscoll AM, Goble RR, Kirkby GR. Vitrectomy for retinal detachments with both peripheral retinal breaks and macular holes. An assessment of outcome and the status of the macular hole. *Retina*. 2001; 21 (3): 221–5.
18. Taxchidi XP, Metaev SA, Glinchuk NYa, Gazal NA. Obosnovanie rannego udaleniya silikonovogo masla pri lechenii tyazhelyx otsloek setchatki razlichnogo geneza. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2004; 5: 60–65. Russian.

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПУТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

А. Е. Блохина<sup>1,2</sup>, К. А. Палкина<sup>1</sup>, Е. С. Шахова<sup>1</sup>, А. К. Малышевская<sup>1,2</sup>, З. М. Осипова<sup>1,3</sup>, Н. М. Мышкина<sup>1</sup> ✉

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

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Лекарственные препараты играют неоспоримую роль в продлении жизни и повышении ее качества. Для получения лекарственных соединений исследователи традиционно обращаются к природным источникам и химическому синтезу, однако в настоящее время активно развиваются биотехнологические методы, позволяющие внедрять группы генов, кодирующие новые метаболические пути, в геномы гетерологических хозяев и регулировать активность их собственных метаболических путей. Такой подход дает возможность воспроизводить биосинтез биологически активных соединений в гетерологических хозяевах, сочетает достоинства традиционных методов их получения и обходит недостатки этих методов. С нашей точки зрения, применение метаболической инженерии для получения лекарственных соединений приобретает все большее значение в производстве.

**Ключевые слова:** гетерологическая экспрессия генов, метаболические пути, метаболическая инженерия, биосинтез лекарственных соединений

**Финансирование:** исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-74-00075, <https://rscf.ru/project/21-74-00075/>

**Благодарности:** научному сотруднику лаборатории химии метаболитических путей А. С. Щеглову за ценные критические замечания.

**Вклад авторов:** А. Е. Блохина, К. А. Палкина, Е. С. Шахова, А. К. Малышевская, З. М. Осипова — анализ литературы, обработка данных, Н. М. Мышкина — анализ литературы, обработка данных, руководство проектом, написание статьи.

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

**Статья получена:** 05.04.2023 **Статья принята к печати:** 19.04.2023 **Опубликована онлайн:** 26.04.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.014

## METABOLIC ENGINEERING IS A PROMISING WAY TO GENERATE HIGHLY EFFECTIVE PRODUCERS OF BIOACTIVE SUBSTANCES

Blokhina AE<sup>1,2</sup>, Palkina KA<sup>1</sup>, Shakhova ES<sup>1</sup>, Malyshevskaya AK<sup>1,2</sup>, Osipova ZM<sup>1,3</sup>, Myshkina NM<sup>1</sup> ✉

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Medicines play an indisputable role in life extension and improvement of the quality of life. To obtain medicinal compounds, researchers traditionally rely on natural sources and chemical synthesis, however, currently developing biotechnological methods allow one to introduce the group of genes encoding new metabolic pathways into the genomes of heterologous hosts and regulate activity of the hosts' intrinsic metabolic pathways. Such an approach makes it possible to reproduce biosynthesis of bioactive substances in heterologous hosts, the approach combines the benefits of conventional methods and works around the shortcomings of those. In our view, the use of metabolic engineering to obtain medicinal compounds is becoming increasingly important for their production.

**Keywords:** heterologous gene expression, metabolic pathways, metabolic engineering, biosynthesis of medicinal compounds

**Funding:** the study was supported by the Russian Science Foundation Grant № 21-74-00075, <https://rscf.ru/project/21-74-00075/>

**Acknowledgements:** the authors would like to thank A.S. Sheglov, research fellow at the Laboratory of Chemistry of Metabolic Pathways, for valuable criticisms.

**Author contribution:** Blokhina AE, Palkina KA, Shakhova ES, Malyshevskaya AK, Osipova ZM — literature review, data processing; Myshkina NM — literature review, data processing, project management, manuscript writing.

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

**Received:** 05.04.2023 **Accepted:** 19.04.2023 **Published online:** 26.04.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.014

Живые организмы, особенно грибы и растения, являются традиционными источниками биологически активных соединений и лекарственных средств. Однако извлечение этих веществ из природных источников может быть сложным и дорогостоящим процессом из-за их низкого содержания. Развитие методов органического синтеза обеспечило прорыв в производстве лекарств [1], однако не все природные соединения рационально получать химическим путем из-за многостадийности синтетических путей, требований к оптической активности и низких выходов чистого вещества [2, 3]. Биотехнология предлагает альтернативный подход, что позволяет производить лекарственные соединения в гетерологических хозяевах [4], таких как бактерии, дрожжи, растения, водоросли и

плесневые грибы, многие из которых совмещают в себе свойства быстрого роста, простоты культивирования и ее невысокой стоимости.

Экспрессия гетерологических генов предоставляет возможности для программирования новых свойств организма хозяина на клеточном и организменном уровнях, включая продукцию атипичных для него веществ в больших количествах [5]. Поскольку биологически активные соединения обычно не могут быть закодированы одним геном, все более популярными становятся проекты метаболической инженерии целых биохимических путей. Интеграцию длинных мультигенных конструкций в геном организма хозяина поддерживает развитие методов сборки [6] и доставки ДНК [7]. Регулирование собственных



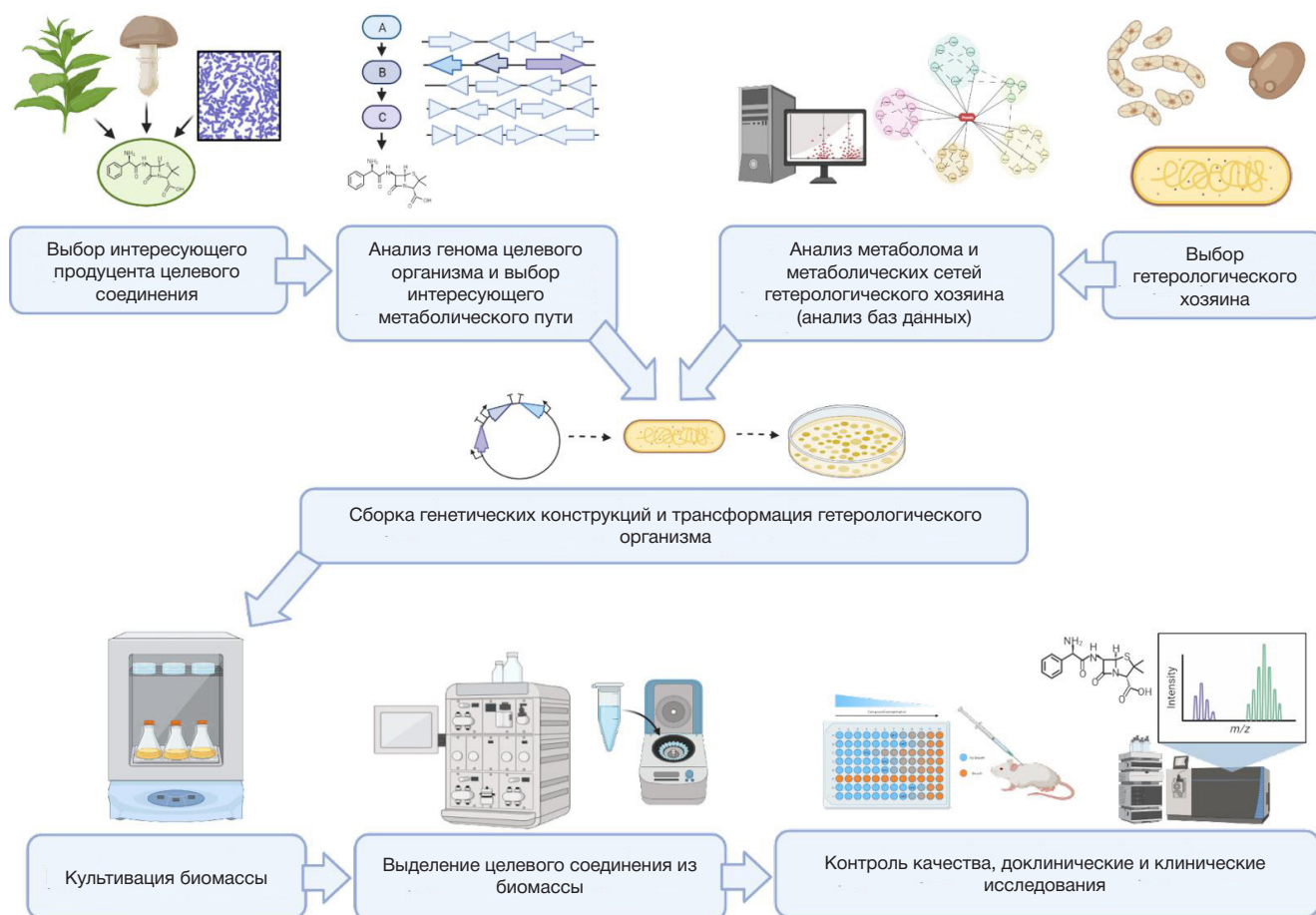


Рис. Схема современного подхода к получению биологически активных соединений в гетерологических хозяевах

метаболических путей хозяина существенным образом влияет на успешность подобных проектов, поскольку позволяет клетке-хозяину производить необходимые промежуточные метаболиты в соответствующих количествах. Одним из таких примеров является, например, создание автотрофных дрожжей *Pichia pastoris* [8].

Метаболические пути в любом организме образуют сложные метаболические сети, поэтому для выбора точек регуляции метаболизма в гетерологическом хозяине крайне важно иметь детальное представление о ферментативных составляющих конкретных биосинтетических путей и их продуктах. Для этой цели могут быть использованы различные базы данных, такие как KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [9], BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase) [10] и PathBank [11], а также базы данных коэкспрессии генов, например, ATTED-II (Arabidopsis thaliana trans-factor and cis-element prediction database), которая предназначена для арабидопсиса [12]. Тем не менее, в случае малоизученных генов или организмов встроенные алгоритмы этих баз данных могут быть недостаточно информативными; тогда применяются биоинформатические инструменты, основанные на алгоритмах машинного обучения, чья предсказательная способность совершенствуется со временем [13].

После определения точек регуляции метаболизма биохимические пути могут быть настроены с помощью точечного редактирования генома и/или эпигенетических регуляций. С учетом общих тенденций перехода от ненаправленных воздействий к более специфическим, тонкое регулирование уровня экспрессии генов хозяина

становится все более популярным и доступным. Для активации генов можно использовать, в частности, гидовые РНК и искусственные транскрипционные факторы на основе Cas9 [14, 15].

Комбинированный подход по внедрению гетерологических метаболических путей и перенаправлению собственных метаболических путей хозяина (см. рисунок) приводит к впечатляющим результатам биосинтеза целевого биологически активного соединения в гетерологическом хозяине [4].

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи биосинтеза лекарственных соединений с помощью метаболической инженерии основаны на комбинации нескольких ортогональных подходов. Для успешной реализации необходимо определить кратчайший метаболический путь к нужному веществу или свойству с использованием баз данных, установить лимитирующие стадии с помощью классических моделей биохимии или алгоритмов машинного обучения, выбрать оптимальный метод трансформации генома хозяина, сконструировать генетические конструкции, совместимые с выбранным хозяином, охарактеризовать метаболический ландшафт организма-хозяина и осуществить регулирование активности его собственных биохимических путей для направления метаболитных потоков в сторону гетерологического пути. Развитие современных технологий позволяет повысить эффективность каждого из этих этапов, что в итоге приводит к получению нового источника лекарственного соединения.

## Литература

- Liebig J. Ueber die Zersetzung des Alkohols durch Chlor. *Ann Pharmacother.* 1832; 1: 31–32.
- Campos KR, Coleman PJ, Alvarez JC, Dreher SD, Garbaccio RM, Terrett NK, et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. *Science.* 2019; 363. DOI: 10.1126/science.aat0805.
- Blakemore DC, Castro L, Churcher I, Rees DC, Thomas AW, Wilson DM, et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nat Chem.* 2018; 10: 383–94.
- Dhakal D, Kim E-S, Koffas M. Editorial: Engineering the Microbial Platform for the Production of Biologics and Small-Molecule Medicines. *Frontiers in Microbiology.* 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02307.
- Diamos AG, Hunter JGL, Pardhe MD, Rosenthal SH, Sun H, Foster BC, et al. High Level Production of Monoclonal Antibodies Using an Optimized Plant Expression System. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 472.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One.* 2011; 6: e16765.
- Demirer GS, Zhang H, Goh NS, González-Grandío E, Landry MP. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. *Nat Protoc.* 2019; 14: 2954–71.
- Gassler T, Sauer M, Gasser B, Egermeier M, Troyer C, Causon T, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>. *Nat Biotechnol.* 2020; 38: 210–16.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 29–34.
- Schomburg I, Chang A, Hofmann O, Ebeling C, Ehrentreich F, Schomburg D. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 54–56.
- Wishart DS, Li C, Marcu A, Badran H, Pon A, Budinski Z, et al. PathBank: a comprehensive pathway database for model organisms. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48: D470–8.
- Obayashi T, Kinoshita K, Nakai K, Shibaoka M, Hayashi S, Saeki M, et al. ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: D863–9.
- Costello Z, Martin HG. A machine learning approach to predict metabolic pathway dynamics from time-series multiomics data. *NPJ Syst Biol Appl.* 2018; 4: 19.
- Selma S, Sanmartín N, Espinosa-Ruiz A, Gianoglio S, Lopez-Gresa MP, Vázquez-Vilar M, et al. Custom-made design of metabolite composition in *N. benthamiana* leaves using CRISPR activators. *Plant Biotechnol J.* 2022; 20: 1578–90.
- García-Pérez E, Diego-Martín B, Quijano-Rubio A, Moreno-Giménez E, Selma S, Orzaez D, et al. A copper switch for inducing CRISPR/Cas9-based transcriptional activation tightly regulates gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Biotechnol.* 2022; 22: 12.

## References

- Liebig J. Ueber die Zersetzung des Alkohols durch Chlor. *Ann Pharmacother.* 1832; 1: 31–32.
- Campos KR, Coleman PJ, Alvarez JC, Dreher SD, Garbaccio RM, Terrett NK, et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. *Science.* 2019; 363. DOI: 10.1126/science.aat0805.
- Blakemore DC, Castro L, Churcher I, Rees DC, Thomas AW, Wilson DM, et al. Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery. *Nat Chem.* 2018; 10: 383–94.
- Dhakal D, Kim E-S, Koffas M. Editorial: Engineering the Microbial Platform for the Production of Biologics and Small-Molecule Medicines. *Frontiers in Microbiology.* 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02307.
- Diamos AG, Hunter JGL, Pardhe MD, Rosenthal SH, Sun H, Foster BC, et al. High Level Production of Monoclonal Antibodies Using an Optimized Plant Expression System. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019; 7: 472.
- Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS One.* 2011; 6: e16765.
- Demirer GS, Zhang H, Goh NS, González-Grandío E, Landry MP. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants. *Nat Protoc.* 2019; 14: 2954–71.
- Gassler T, Sauer M, Gasser B, Egermeier M, Troyer C, Causon T, et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO<sub>2</sub>. *Nat Biotechnol.* 2020; 38: 210–16.
- Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 29–34.
- Schomburg I, Chang A, Hofmann O, Ebeling C, Ehrentreich F, Schomburg D. BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 54–56.
- Wishart DS, Li C, Marcu A, Badran H, Pon A, Budinski Z, et al. PathBank: a comprehensive pathway database for model organisms. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48: D470–8.
- Obayashi T, Kinoshita K, Nakai K, Shibaoka M, Hayashi S, Saeki M, et al. ATTED-II: a database of co-expressed genes and cis elements for identifying co-regulated gene groups in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35: D863–9.
- Costello Z, Martin HG. A machine learning approach to predict metabolic pathway dynamics from time-series multiomics data. *NPJ Syst Biol Appl.* 2018; 4: 19.
- Selma S, Sanmartín N, Espinosa-Ruiz A, Gianoglio S, Lopez-Gresa MP, Vázquez-Vilar M, et al. Custom-made design of metabolite composition in *N. benthamiana* leaves using CRISPR activators. *Plant Biotechnol J.* 2022; 20: 1578–90.
- García-Pérez E, Diego-Martín B, Quijano-Rubio A, Moreno-Giménez E, Selma S, Orzaez D, et al. A copper switch for inducing CRISPR/Cas9-based transcriptional activation tightly regulates gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Biotechnol.* 2022; 22: 12.