

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

В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Ю. П. Пивоваров, д. м. н., академик РАН, профессор (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Ю. Разумовский, член-корр., 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

СОТРУДНИЧЕСТВО 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 (h²) журнала по оценке Google Scholar: 8

Scopus[®]

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.2023-03

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



Подписано в печать 30.06.2023

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

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc, professor

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

EDITORS Valentina Geidebrekht, PhD; Nadezda Tikhomirova

TECHNICAL EDITOR Evgeny Lukyanov

TRANSLATORS Nadezda Tikhomirova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

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)

Kobrinskii BA, DSc, professor (Moscow, Russia)

Kozlov AV, MD PhD, (Vienna, Austria)

Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)

Lebedev MA, PhD (Darem, USA)

Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)

Milushkina OYu, DSc, professor (Moscow, Russia)

Mitupov ZB, DSc, professor (Moscow, Russia)

Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)

Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)

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

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

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

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

Rebrova OYu, DSc (Moscow, Russia)

Rudoy AS, DSc, professor (Minsk, Belarus)

Rylova AK, DSc, professor (Moscow, Russia)

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

COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru

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

Indexed in Scopus. CiteScore 2022: 0.5

Scopus[®]

SCImago Journal & Country Rank 2020: 0.14

SJR
Scimago Journal & Country Rank

Indexed in WoS. JCR 2021: 0.5

WEB OF SCIENCE[™]

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.2023-03

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



Approved for print 30.06.2023

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

4

Уровень апоптоза гранулезных клеток у женщин с нарушением репродуктивной функции и экстрагенитальной патологией

Л. Н. Рогова, Д. С. Липов, В. Н. Перфилова, М. В. Кустова, А. В. Мухина, Д. А. Чурзин

Apoptosis of granulosa cells in women with impaired reproductive function and extragenital pathology

Rogova LN, Lipov DS, Perfiлова VN, Kustova MV, Mukhina AV, Churzin DA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

10

Изменения микробиоты кишечника и их связь с показателями IL6, IL8 и TNF α у пациенток с наружным генитальным эндометриозом

Л. Н. Гуменюк, И. А. Земляная, Алмасуд Рами, Е. С. Бадула, А. Р. Исмаилов, Н. А. Сероштанов, С. С. Кокарева, А. А. Черемисова, Ю. Р. Купрейчук

Gut microbiota alterations and their association with IL6, IL8 and TNF α levels in patients with external genital endometriosis

Gumenyuk LN, Zemlyanaya IA, Rami Almasoud, Badula ES, Ismailov AR, Seroshtanov NA, Kokareva SS, Cheremisova AA, Kupreichyuk YuR

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

17

Редкий случай сочетания трихоринофалангеального синдрома и синдрома Майера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера

З. К. Батырова, А. С. Болшакова, З. Х. Кумыкова, Д. А. Кругляк, Е. В. Уварова, В. Д. Чупрынин, Ф. Ш. Мамедова, И. О. Саделов, Д. Ю. Трофимов

A rare case of combination trichorhinophalangeal syndrome and Mayer–Rokitansky–Küster–Hauser syndrome

Batyrova ZK, Bolshakova AS, Kумыkova ZKH, Kругlyak DA, Uvarova EV, Chuprynin VD, Mamedova FSh, Sadelov IO, Trofimov DY

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

23

Детекция различных форм потери гена *SMN1* с помощью набора для ПЦР-РВ

В. Д. Назаров, К. К. Черембилло, С. В. Лапин, Д. В. Сидоренко, Е. А. Девяткина, А. К. Мусонова, Т. В. Петрова, А. И. Никифорова, А. В. Иванова

Detection of *SMN1* loss with PCR-based screening test

Nazarov VD, Cherebillo CC, Lapin SV, Sidorenko DV, Devyatkina YA, Musonova AC, Petrova TV, Nikiforova AI, Ivanova AV

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

31

Сахарный диабет 1-го типа: особенности дифференциальной диагностики

Е. В. Ганцгорн, О. В. Денисенко, Я. О. Осипенко, Д. А. Калмыкова, А. В. Иванов, С. С. Герасюта, Г. А. Булгурян, М. Х. Иванова, Д. А. Саакян

Type 1 diabetes mellitus: features of differential diagnosis

Gantsgorn EV, Denisenko OV, Osipenko YaO, Kalmykova DA, Ivanov AV, Gerasyuta SS, Bulguryan GA, Ivanova MH, Saakyan DA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

36

Роль кавказского, иранского и степного населения в формировании многообразия аутосомного генофонда Восточного Кавказа

Е. В. Балановская, И. О. Горин, В. С. Петрушенко, Г. Ю. Пономарёв, Р. О. Белов, Э. А. Почешхова, В. А. Салаев, Н. А. Искандаров, В. Ю. Пылёв

The role of Caucasian, Iranian and steppe populations in shaping the diversity of autosomal gene pool of the Eastern Caucasus

Balanovska EV, Gorin IO, Petrushenko VS, Ponomarev GYu, Belov RO, Pocheshkhova EA, Salaev VA, Iskandarov NA, Pylev VYu

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

46

Сравнительное исследование иммуногенности полноразмерной и мультиэпитопной мРНК-вакцин против *M. tuberculosis* по выраженности Т-клеточного ответа у мышей

О. О. Васильева, В. П. Терещенко, Б. Н. Крапивин, А. Р. Муслимов, И. С. Кукушкин, И. И. Патеев, С. А. Рыбцов, Р. А. Иванов, В. В. Решетников

Immunogenicity of full-length and multi-epitope mRNA vaccines for *M. tuberculosis* as demonstrated by the intensity of T-cell response: a comparative study in mice

Vasileva OO, Tereshchenko VP, Krapivin BN, Muslimov AR, Kukushkin IS, Pateev II, Rybtsov SA, Ivanov RA, Reshetnikov VV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

53

Активация микроглии в головном мозге спонтанно гипертензивных крыс

В. В. Гусельникова, В. А. Разенкова, Д. А. Суфиева, Д. Э. Коржевский

Activation of microglia in the brain of spontaneously hypertensive rats

Guselnikova VV, Rازenkova VA, Sufieva DA, Korzhevskii DE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

61

Морфологические особенности регенерации слизистой оболочки полости рта при применении полимерных пьезоэлектрических мембран

А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, А. Е. Лейман, Д. О. Рафиев, Е. Н. Большасов, К. С. Станкевич

Morphological peculiarities of regeneration of oral mucosa associated with use of polymeric piezoelectric membranes

Konjaeva AD, Varakuta EYu, Leiman AE, Rafiev DO, Bolbasov EN, Stankevich KS

УРОВЕНЬ АПОПТОЗА ГРАНУЛЕЗНЫХ КЛЕТОК У ЖЕНЩИН С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ И ЭКСТРАГЕНИТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Л. Н. Рогова¹, Д. С. Липов¹✉, В. Н. Перфилова², М. В. Кустова¹, А. В. Мухина³, Д. А. Чурзин¹

¹ Волгоградский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, Россия

² Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоград, Россия

³ Отделение вспомогательных репродуктивных технологий. Многопрофильная клиника № 1, Волгоград, Россия

Гранулезные клетки питают и защищают ооцит во время его созревания. Известно, что абберантный апоптоз в этих клетках может привести к нарушению оогенеза. На современном уровне знаний нет исчерпывающей информации о влиянии экстрагенитального воспаления на апоптоз в гранулезных клетках, что становится актуальной проблемой из-за распространения воспалительных заболеваний и роста бесплодия у женщин. Цель исследования — оценить уровень апоптоза гранулезных клеток у женщин с нарушением репродуктивной функции, имеющих в анамнезе хронические заболевания дыхательной и/или пищеварительной систем воспалительного генеза, а также определить наличие взаимосвязи между изучаемым параметром и репродуктивной дисфункцией в исследуемой группе. Исследовали образцы гранулезных клеток 60 женщин, имеющих патологию воспалительного генеза дыхательной и/или пищеварительной систем в анамнезе, проходивших лечение бесплодия методами ЭКО с 2021 по 2022 г. Образцы клеток были собраны из фолликулярной жидкости, полученной во время трансвагинальной пункции преовуляторных фолликулов. Оценку апоптоза проводили методом проточной цитометрии. Для статистического анализа использовали F-критерий Фишера и критерий Краскела–Уоллиса. Установлено, что у женщин без экстрагенитальной патологии в анамнезе ($n = 20$) уровень апоптоза гранулезных клеток составил $0,0088 \pm 0,0062\%$, что достоверно ниже, чем у женщин группы с воспалительными заболеваниями пищеварительной системы в анамнезе ($n = 20$) — $0,0140 \pm 0,0099\%$ ($p = 0,015$) и группы женщин с воспалительными заболеваниями дыхательной системы в анамнезе — $0,0650 \pm 0,0391\%$ ($p = 0,033$), а результативность ЭКО была выше у представительниц первой группы.

Ключевые слова: апоптоз, гранулезные клетки, бесплодие, проточная цитометрия

Вклад авторов: Л. Н. Рогова — планирование исследования, анализ и интерпретация данных; Д. С. Липов — подготовка рукописи, анализ полученных данных; В. Н. Перфилова, М. В. Кустова — определение уровня апоптоза гранулезных клеток методом проточной цитометрии; А. В. Мухина — сбор образцов гранулезных клеток у пациенток; Д. А. Чурзин — анализ литературы, статистическая обработка полученных данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (протокол № 2021/053 от 27 мая 2021 г.), проведено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000). Все участники исследования подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Данил Сергеевич Липов
ул. Высокая, д. 18а, г. Волгоград, 400127, Россия; danillipov@yandex.ru

Статья получена: 12.05.2023 **Статья принята к печати:** 07.06.2023 **Опубликована онлайн:** 17.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.019

APOPTOSIS OF GRANULOSA CELLS IN WOMEN WITH IMPAIRED REPRODUCTIVE FUNCTION AND EXTRAGENITAL PATHOLOGY

Rogova LN¹, Lipov DS¹✉, Perfilova VN², Kustova MV¹, Mukhina AV³, Churzin DA¹

¹ Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, Russia

² Innovative Medicines R&D and Piloting Center, Volgograd, Russia

³ Department of Assisted Reproductive Technologies. Multidisciplinary Clinic No. 1, Volgograd, Russia

Granulosa cells feed the oocyte during its maturation and protect it. Aberrant apoptosis in these cells is known to ultimately impair oogenesis. The current knowledge of how extragenital inflammation affects apoptosis in granulosa cells is incomprehensive, which is the root of an urgent problem connected to the spread of inflammatory diseases and the growing level of female infertility. This study aimed to assess the intensity of granulosa cell apoptosis in women with impaired reproductive function that suffer from chronic respiratory and/or digestive system diseases of inflammatory origin, and to identify the link, if any, between the studied factor and dysfunction of the reproductive system in the test group. The group included 60 women with a history of respiratory and/or digestive system inflammatory pathology that underwent IVF in 2021–2022. The women were donors of the granulosa cells from the follicular fluid collected through transvaginal puncture of preovulatory follicles. We studied the apoptosis process with the help of flow cytometry. For statistical analysis, we used the Fisher's F-test and the Kruskal–Wallis test. Twenty participants without extragenital pathology in their medical histories, the first subgroup, had the level of apoptosis in granulosa cells at $0.0088 \pm 0.0062\%$, which is significantly lower than in twenty donors with a history of chronic inflammatory digestive system diseases, the second subgroup (granulosa cell apoptosis at $0.0140 \pm 0.0099\%$, $p = 0.015$), and the subgroup of women suffering from inflammatory diseases of the respiratory system (granulosa cell apoptosis at $0.0650 \pm 0.0391\%$, $p = 0.033$); the efficacy of IVF was higher in the first subgroup.

Keywords: apoptosis, granulosa cells, infertility, flow cytometry

Author contribution: LN Rogova — study planning, data analysis and interpretation; DS Lipov — manuscript authoring, analysis of the study data; VN Perfilova, MV Kustova — determination of the level of apoptosis in granulosa cells by flow cytometry; AV Mukhina — collection of the granulosa cell samples from patients; DA Churzin — analysis of the published papers, statistical processing of the obtained data.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Volgograd State Medical University (Minutes № 2021/053 of May 27, 2021) and conducted in compliance with the ethics principles of the WMA Declaration of Helsinki (2000). All donors have voluntarily signed the participant consent forms.

✉ **Correspondence should be addressed:** Danil S. Lipov
Vysokaya, 18a, Volgograd, 400127, Russia; danillipov@yandex.ru

Received: 12.05.2023 **Accepted:** 07.06.2023 **Published online:** 17.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.019

Бесплодие на сегодняшний день является актуальной и до конца не решенной проблемой, затрагивающей как мужчин, так и женщин. По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире насчитывается 50–80 млн пар, страдающих нарушением репродуктивной функции. В частности, в нашей стране, по оценкам исследователей, до 15% пар имеют проблемы с фертильностью.

Проблема женского бесплодия привлекает значительное внимание исследователей из-за сложности строения и физиологии женской репродуктивной системы и решающей роли, которую она играет в репродукции человека [1]. Принято выделять несколько факторов, приводящих к нарушению женской фертильности, такие как возраст, наличие хронических заболеваний, образ жизни, токсины окружающей среды и генетические особенности [2]. В последнее время активно изучают взаимосвязь между хронической экстрагенитальной патологией воспалительного генеза и развитием бесплодия. Известно, что экстрагенитальная патология может оказывать значительное влияние на женскую репродуктивную систему, приводя к нарушениям фертильности [2, 3]. Такие заболевания, как сахарный диабет, аутоиммунные процессы, заболевания щитовидной железы, дисфункция иммунной и гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы, могут негативно влиять на функцию матки, яичников и процесс созревания ооцитов [2, 3]. Нарушение процессов созревания ооцитов большинство исследователей называют как одну из основных причин женского бесплодия [3, 4].

Оогенез — сложный и многоступенчатый процесс, который контролируется взаимодействием различных типов клеток, гормонов, факторов роста и сигнальных молекул. Любое нарушение в нем может привести к множеству проблем с фертильностью, так как качество яйцеклеток имеет первостепенное значение для успешного зачатия и беременности [4].

Одну из ключевых ролей в созревании ооцита играет взаимодействие соматических клеток, окружающих его, включая гранулезные и так называемые кумулюсные клетки [5]. Хотя гранулезные и кумулюсные клетки имеют с гистологической точки зрения общее происхождение, они выполняют разные функции. Гранулезные клетки отвечают, в частности, за выработку эстрогена и участвуют в регуляции фолликулолестимулирующего гормона, необходимого для развития фолликула [6, 7]. Недавно проведенные исследования показали, что гранулезные клетки напрямую влияют на качество яйцеклеток, поскольку продуцируют ряд факторов роста и других сигнальных молекул, определяющих их созревание [8].

Кумулюсные клетки представляют собой специализированные клетки, которые находятся в непосредственной близости от созревающего ооцита. Они обеспечивают физическую и биохимическую поддержку развивающейся яйцеклетке, отвечают за выработку ряда факторов роста и других сигнальных молекул, например, гиалуроновой кислоты [9, 10].

Ряд исследователей количественно и качественно оценивают апоптоз в гранулезных и кумулюсных клетках, а также его влияние на процессы созревания ооцита. Отмечается, что ингибирование апоптоза в гранулезных клетках способствует росту фолликулов и улучшению качества яйцеклеток [8]. Другие авторы показали, что избирательный апоптоз гранулезных клеток во время созревания ооцита все же необходим для успешной

ооуляции [11]. Установлено, что регуляция апоптоза находится под сложным взаимодействием сигнальных путей, включая систему Fas/FasL и семейство белков Bcl-2 [12]. Многие эксперты сходятся во мнении, что исследование механизмов, лежащих в основе апоптоза в гранулезных и кумулюсных клетках, необходимы для разработки таргетных методов лечения бесплодия и других нарушений репродуктивной функции [12, 13].

Однако надо отметить, что объектами большинства исследований были клетки, полученные у животных (мыши, крысы, свиньи), а человеческие образцы использовали для изучения в единичных случаях. Поэтому в нашей работе для более детальной оценки процесса оогенеза, его роли в женской фертильности мы использовали гранулезные клетки, полученные от пациенток, проходивших лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Целью исследования было оценить уровень апоптоза гранулезных клеток у женщин с нарушением репродуктивной функции, имеющих в анамнезе хронические заболевания дыхательной и/или пищеварительной систем воспалительного генеза, а также определить, имеется ли взаимосвязь между изучаемым параметром и репродуктивной дисфункцией в исследуемой группе.

Результаты исследования могут дать представления о глубинных механизмах патогенеза бесплодия, что потенциально может быть использовано для разработки новых методов лечения и таргетной терапии для улучшения репродуктивных результатов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование относится к разнонаправленным когортным исследованиям, дизайн представлен на рисунке. В работе проанализированы образцы гранулезных клеток 60 пациенток, проходивших лечение бесплодия методами ВРТ в Клинике № 1 ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в период с 2021 по 2022 г. В исследовании участвовали женщины репродуктивного возраста, имеющие в анамнезе экстрагенитальную патологию воспалительного генеза органов пищеварения или дыхательной системы. Данный вид экстрагенитальной патологии был выбран в связи с высокой степенью распространенности в популяции и ранее проведенными исследованиями, которые указывают на снижение эффективности лечения бесплодия методами ВРТ у лиц данной категории [14].

После анализа медицинской документации для исследования был произведен отбор пациентов по следующим критериям включения: возраст пациенток 20–45 лет; наличие в анамнезе подтвержденного хронического воспалительного заболевания пищеварительной системы (гастриты, дуодениты, язвенная болезнь желудка и (или) двенадцатиперстной кишки, панкреатиты) или воспалительного заболевания дыхательной системы (хроническая патология — хронические бронхиты или частая острая патология (более 4 раз в год) — ОРВИ, грипп, бронхит, ларингит, трахеит, пневмония), для контрольной группы отбирались пациентки без экстрагенитальной патологии в анамнезе; период предшествующего бесплодия не менее года; наличие подписанного информированного добровольного согласия пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения из исследования: сочетанная патология дыхательной и пищеварительной системы в

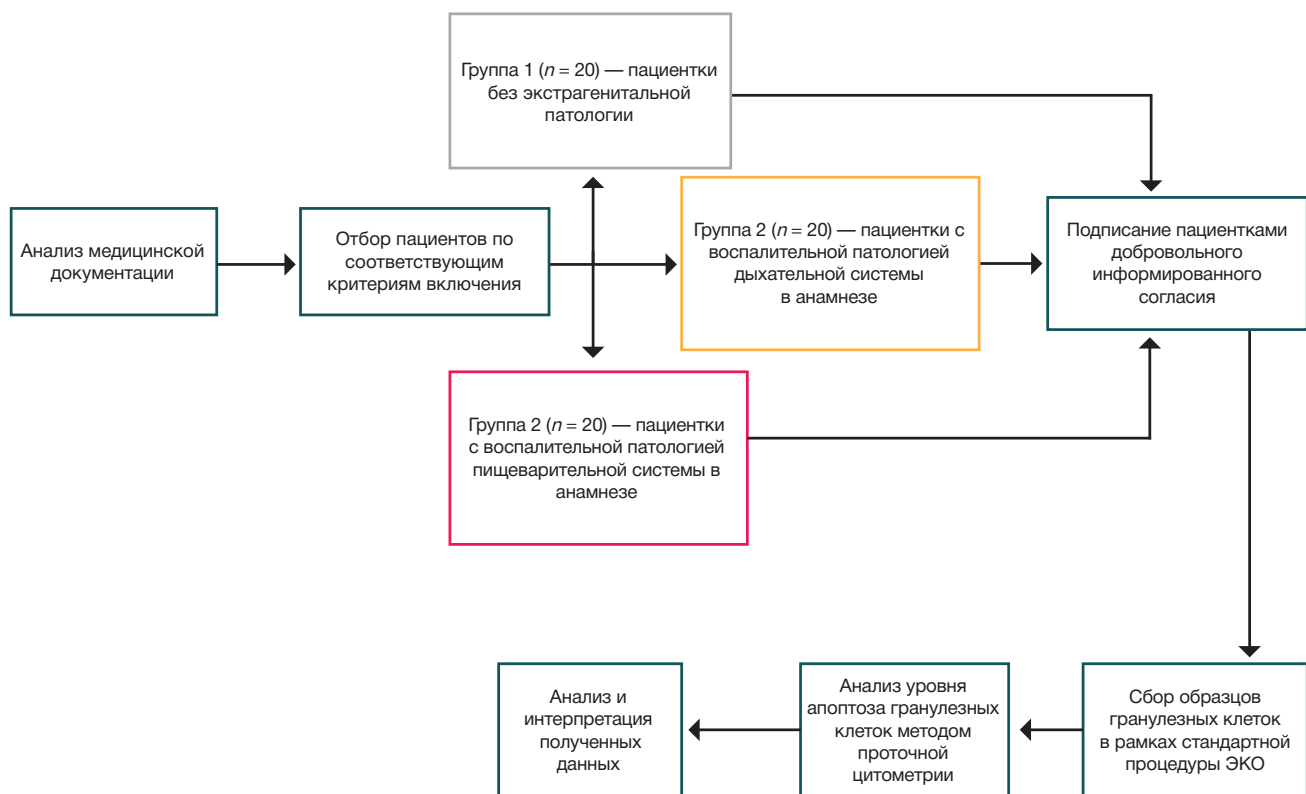


Рис. Дизайн исследования

анамнезе; онкологические заболевания в анамнезе; отказ пациентки от исследования и обработки персональных данных; социально незащищенные группы населения.

Всего для исследования было отобрано 60 пациенток, которых разделили на три группы: группа 1 ($n = 20$) — женщины, не имеющие экстрагенитальную патологию в анамнезе; группа 2 ($n = 20$) — женщины, имеющие воспалительные заболевания дыхательной системы в анамнезе (хроническая патология — хронические бронхиты или частая острая патология (более 4 раз в год) — ОРВИ, грипп, бронхит, ларингит, трахеит, пневмония); группа 3 ($n = 20$) — женщины, имеющие хронические воспалительные заболевания пищеварительной системы в анамнезе (гастриты, дуодениты, язвенная болезнь желудка и (или) двенадцатиперстной кишки, панкреатиты). Количество отобранных пациентов было ограничено техническими возможностями проведения дальнейшего исследования апоптоза в образцах гранулезных клеток.

Возраст женщин варьировал от 21 до 43 лет и в среднем составил $33,5 \pm 4,7$ года. Период предшествующего бесплодия у обследованных был равен 4–16 годам, в среднем $7,4 \pm 1,5$ года. Для установления причин бесплодия пациенткам проводили стандартное клинико-лабораторное обследование и собирали подробный анамнез о наличии экстрагенитальной патологии. Стимуляцию овуляции во всех лечебных циклах, а также все последующие процедуры осуществляли в строгом соответствии с общепринятыми клиническими рекомендациями и протоколами [15].

Образцы гранулезных клеток были собраны из фолликулярной жидкости, полученной во время трансвагинальной пункции преовуляторных фолликулов. Клетки помещали в буферный раствор (гепарин 10МЕ/мл, раствор альбумина человека 1%, рекомбинантный инсулин человека 0,01%, гентамицина сульфат 10 мкг/мл) и транспортировали в лабораторию для определения

уровня апоптоза. Время от момента забора образцов до проведения анализа в лаборатории не превышало 3 ч.

Оценку количества клеток с признаками апоптоза проводили с использованием коммерческого набора для проточной цитометрии «Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI» (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.; США). Суспензию клеток отмывали физиологическим раствором. Отмытые гранулезные клетки подсчитывали, затем ресуспензировали в аннексин-связывающем буфере для получения концентрации 1×10^6 клеток в мл, инкубировали 15 мин при комнатной температуре с аннексином V-FITC и йодидом пропидия (PI), согласно инструкции производителя набора. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Thermo Fisher Scientific Inc.; США) (не менее 10 тыс. событий). Результаты интерпретировали следующим образом: живые клетки не проявляли флуоресценции (Annexin V-FITC-/PI-), клетки в состоянии раннего апоптоза — Annexin V-FITC+/PI-, клетки в состоянии позднего апоптоза — Annexin V-FITC+/PI+.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы StatTech v. 2.8.8 («Статтех»; Россия). Количественные показатели оценивали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывали с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95%-го доверительного интервала (95% ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывали с помощью медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (Q_1 – Q_3). Сравнение трех и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполняли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводили с помощью критерия Фишера

Таблица 1. Показатель живых гранулезных клеток и уровень апоптоза в них в исследуемых группах. ¹ — используемый статистический метод: критерий Фишера (F); ² — используемый статистический метод: критерий Краскела–Уоллиса

Исследуемая группа	Показатель живых гранулезных клеток (%) ¹	Показатель раннего апоптоза гранулезных клеток (%) ¹	Показатель позднего апоптоза гранулезных клеток (%) ²
Группа 1 (женщины, не имеющие экстрагенитальную патологию в анамнезе)	0,2673 ± 0,0151 p_1 (группа 1 – группа 2) = 0,001 p_2 (группа 1 – группа 3) = 0,001	0,0088 ± 0,0062 p_1 (группа 1 – группа 2) = 0,033 p_2 (группа 1 – группа 3) = 0,015	0,0028 [0,0012–0,0046] p_1 (группа 1 – группа 2) < 0,001 p_2 (группа 1 – группа 3) = 0,008
Группа 2 (женщины, имеющие воспалительные заболевания дыхательной системы в анамнезе)	0,1946 ± 0,0227 p (группа 2 – группа 3) = 0,008	0,0650 ± 0,0391 p (группа 2 – группа 3) = 0,026	0,0300 [0,0161–0,0393] p (группа 2 – группа 3) < 0,001
Группа 3 (женщины, имеющие воспалительные заболевания пищеварительной системы в анамнезе)	0,2195 ± 0,0154	0,0140 ± 0,0099	0,0132 [0,0102–0,0206]

(при условии равенства дисперсий), критерия Уэлча (при неравных дисперсиях). Сравнение трех и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполняли с помощью критерия Краскела–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании уровня апоптоза в гранулезных клетках установлено, что наиболее активно этот процесс протекал в группе женщин, имеющих в анамнезе воспалительную патологию дыхательной системы, менее активно — у женщин, имеющих в анамнезе воспалительные заболевания пищеварительной системы, а наименьший показатель был в группе женщин без патологии в анамнезе (табл. 1).

Для оценки влияния уровня апоптоза гранулезных клеток на процессы оогенеза и оплодотворения у пациенток исследуемых групп было определено количество зрелых ооцитов, полученных в ходе трансвагинальной пункции преовуляторных фолликулов, и количество оплодотворенных яйцеклеток в результате экстракорпорального оплодотворения. Установлено, что наибольшее количество зрелых ооцитов и наилучший результат оплодотворения был у женщин, не имеющих экстрагенитальную патологию в анамнезе, а наименьшее количество зрелых ооцитов и, соответственно, более негативный результат оплодотворения — у женщин, имеющих воспалительные заболевания дыхательной системы в анамнезе (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования установлено, что экстрагенитальная воспалительная патология

пищеварительной и дыхательной систем в анамнезе пациенток влияет на процесс оогенеза. Это подтверждается тем фактом, что у женщин без вышеуказанных заболеваний количество зрелых ооцитов, полученных в результате пункции фолликулов, составляло $13,44 \pm 2,60$, тогда как у женщин, имеющих патологию дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта воспалительного генеза, количество ооцитов было достоверно ниже — $4,47 \pm 2,00$ ($p = 0,001$) и $7,10 \pm 1,85$ ($p = 0,001$) соответственно. Известно, что при воспалительных заболеваниях как пищеварительной, так и дыхательной систем происходит динамическое персистенция в крови различных медиаторов воспаления, таких как интерлейкины, факторы некроза опухоли и др. [16, 17]. В литературе имеются сведения, что ряд цитокинов, например И6 и И8, являются негативными регуляторами оогенеза, поскольку их высокий уровень в крови связан с низким качеством яйцеклеток, не способных к оплодотворению [18].

Известно, что процесс созревания женских гамет достаточно сложен и его контролирует ряд механизмов и факторов, в том числе взаимодействие ооцита с соматическими клетками микроокружения. В связи с тем что гранулезные клетки обеспечивают оптимальные условия для оогенеза [6], чрезмерная индукция апоптоза в них может способствовать гибели яйцеклетки или нарушению нормального ее созревания [19]. Увеличение содержания в крови И2, И4, TNF α и др. при воспалительных заболеваниях дыхательной и пищеварительной систем может выступать в качестве индукторов апоптоза, посредством увеличения количества активных форм кислорода и снижением трансмембранного митохондриального потенциала, что может запускать внутренний путь запрограммированной клеточной гибели [20]. С этим может быть связан тот факт, что у женщин, не имеющих экстрагенитальную патологию, процент живых гранулезных клеток был статистически

Таблица 2. Результаты лечения пациенток исследуемых групп методами вспомогательных репродуктивных технологий. ¹ — используемый статистический метод: критерий Фишера (F); ² — используемый статистический метод: критерий Краскела–Уоллиса

Исследуемая группа	Количество полученных зрелых ооцитов при пункции фолликулов ¹	Количество оплодотворенных яйцеклеток ²
Группа 1 (женщины, не имеющие экстрагенитальную патологию в анамнезе)	13,44 ± 2,60 p_1 (группа 1 – группа 2) = 0,001 p_2 (группа 1 – группа 3) = 0,001	11,00 [9,00 – 12,00] p_1 (группа 1 – группа 2) < 0,001 p_2 (группа 1 – группа 3) = 0,020
Группа 2 (женщины, имеющие воспалительные заболевания дыхательной системы в анамнезе)	4,47 ± 2,00 p (группа 2 – группа 3) = 0,013	3,00 [2,50–3,00] p (группа 2 – группа 3) = 0,038
Группа 3 (женщины, имеющие воспалительные заболевания пищеварительной системы в анамнезе)	7,10 ± 1,85	5,50 [4,00–6,75]

значимо выше ($0,2673 \pm 0,0151\%$), а показатель раннего и позднего апоптоза значимо ниже ($0,0088 \pm 0,0062\%$ и $0,0028\%$ [$0,0012-0,0046\%$]), чем у пациенток, имеющих хроническую воспалительную патологию пищеварительной системы (количество живых клеток — $0,2195 \pm 0,0154\%$, показатель раннего и позднего апоптоза — $0,0140 \pm 0,0099\%$ и $0,0132\%$ [$0,0102-0,0206\%$]) и у пациенток с хронической воспалительной патологией дыхательной системы (количество живых клеток — $0,1946 \pm 0,0227\%$, показатель раннего и позднего апоптоза — $0,0650 \pm 0,0391\%$ и $0,0300\%$ [$0,0161-0,0393\%$]).

Необходимо также отметить, что у женщин, имеющих заболевания дыхательной системы, был самый низкий показатель живых клеток и самый высокий уровень раннего и позднего апоптоза гранулезных клеток, и, соответственно, более негативные результаты оогенеза (малое число зрелых ооцитов) и оплодотворения по сравнению с другими исследуемыми группами. Это, вероятно, можно объяснить тем, что у данной группы пациенток на фоне имеющейся патологии может развиваться гипоксия, которая, в свою очередь, может

служить дополнительным индуктором апоптоза и нарушать процессы оогенеза [21].

Выводы

Экстрагенитальная патология дыхательной и пищеварительной систем воспалительного генеза ассоциируется с повышением уровня апоптоза в гранулезных клетках, что влияет на процессы оогенеза и негативно сказывается на фертильности у женщин. Экстрагенитальная воспалительная патология дыхательной системы в большей степени влияет на процент апоптоза и жизнеспособность гранулезных клеток. С этим связано ухудшение показателей результативности лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий у данной группы пациенток по сравнению с контрольной группой. Результаты исследования могут быть использованы в разработке новых подходов в оптимизации подготовки к экстракорпоральному оплодотворению женщин с хроническими воспалительными заболеваниями дыхательной и пищеварительной систем в анамнезе.

Литература

- Chih HJ, Elias FTS, Gaudet L, Velez MP. Assisted reproductive technology and hypertensive disorders of pregnancy: systematic review and meta-analyses. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2021; 21: 449.
- Сандакова Е. А., Осипович О. А., Годовалов А. П., Карпунина Т. И. Эффективность вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с гинекологическими и экстрагенитальными воспалительными заболеваниями в анамнезе. *Медицинский альманах*. 2017; 6 (51): 69–72.
- Anjos JGGD, Carvalho NS, Saab KA, Araujo E, Kulak J. Evaluation of the Seroprevalence of Infectious Diseases in 2,445 in vitro Fertilization Cycles. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*. 2021; 43 (3): 216–9.
- Heber MF, Ptak GE. The effects of assisted reproduction technologies on metabolic health and disease. *Biology of Reproduction*. 2021; 104 (4): 734–44.
- King ML. Molecular control of oogenesis: Progress and perspectives. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2017; 28 (2): 97–107.
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010; 22 (5): 393–9.
- Hsueh AJ, Ortega MV. Oocyte development: The role of gonadotropins. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2015; 33 (4): 196–206.
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: Basic biology and clinical implications. *Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120 (4): 963–72.
- El-Hayek S, Demeestere I, Clarke HJ, Scott RT. In vitro growth of human follicles: Past, present, and future. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018; 35 (4): 571–88.
- Turathum B, Gao EM, Chian RC. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. *Cells*. 2021; 2-10 (9): 2292.
- Jagarlamudi K, Adhikari D. Oocyte-somatic cell communication in reproductive health and disease. *Development*. 2010; 137 (18): 2927–34.
- Zheng Y, Ma L, Liu N, Tang X, Guo S, Zhang B, et al. Autophagy and Apoptosis of Porcine Ovarian Granulosa Cells During Follicular Development. *Animals (Basel)*. 2019; 10-9 (12): 1111.
- Sun C, Zhang F, Li X, Liu Y, Li Q, Li J, et al. Apoptosis induced by patulin in mouse primary Leydig cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial and endoplasmic reticulum stress signaling pathways. *Oncotarget*. 2010; 7 (29): 44992–5005.
- Рогова Л. Н., Липов Д. С., Тихаева К. Ю., Мухина А. В., Корнев А. В., Чурзин Д. А. Влияние сопутствующей экстрагенитальной патологии на успешность процедур вспомогательных репродуктивных технологий у женщин (по данным клиник Волгоградской области). *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2023; (1): 92–96.
- Коган И. Ю., Гзгзян А. М., Лесик Е. А. Протоколы стимуляции яичников в циклах ЭКО: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020; 159 с.
- Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev*. 2009; 8 (7): 538–42.
- Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 2019; 16; 50 (4): 778–95.
- Oktay K, Rodriguez-Wallberg KA, Salgado-Moran G. The role of interleukin-8 in the physiology and pathophysiology of the reproductive system. *Human Reproduction Update*. 2019; 25 (4): 411–28.
- Зенкина В. Г. Значение апоптоза в яичниках при развитии некоторых заболеваний репродуктивной системы. *Фундаментальные исследования*. 2011; 6: 227–30.
- Чечина О. Е., Биктасова А. К., Сазонова Е. В., Жукова О. Б., Прохоренко Т. С., Крат И. В., и др. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза. *Бюллетень сибирской медицины*. 2009; 2: 67–72.
- Yang Z, Hong W, Zheng K, Feng J, Hu C, Tan J, et al. Chitosan oligosaccharides alleviate H2O2-stimulated granulosa cell damage via HIF-1 α signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022: 4247042.

References

- Chih HJ, Elias FTS, Gaudet L, Velez MP. Assisted reproductive technology and hypertensive disorders of pregnancy: systematic review and meta-analyses. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2021; 21: 449.
- Sandakova EA, Osipovich OA, Godovalov AP, Karpunina TI. Ehffektivnost' vspomogatel'nyh reproduktivnyh tehnologij u zhenshin s ginekologicheskimi i ehkstragenital'nymi vospalitel'nymi zabolevaniyami v anamneze. *Medicinskij al'manah*. 2017; 6 (51): 69–72. Russian.
- Anjos JGGD, Carvalho NS, Saab KA, Araujo E, Kulak J. Evaluation of the Seroprevalence of Infectious Diseases in 2,445 in vitro Fertilization Cycles. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*. 2021; 43 (3): 216–9.
- Heber MF, Ptak GE. The effects of assisted reproduction technologies on metabolic health and disease. *Biology of Reproduction*. 2021; 104 (4): 734–44.
- King ML. Molecular control of oogenesis: Progress and perspectives. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2017; 28 (2): 97–107.
- Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010; 22 (5): 393–9.
- Hsueh AJ, Ortega MV. Oocyte development: The role of gonadotropins. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2015; 33 (4): 196–206.
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: Basic biology and clinical implications. *Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120 (4): 963–72.
- El-Hayek S, Demeestere I, Clarke HJ, Scott RT. In vitro growth of human follicles: Past, present, and future. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2018; 35 (4): 571–88.
- Turathum B, Gao EM, Chian RC. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. *Cells*. 2021; 2-10 (9): 2292.
- Jagaramudi K, Adhikari D. Oocyte-somatic cell communication in reproductive health and disease. *Development*. 2010; 137 (18): 2927–34.
- Zheng Y, Ma L, Liu N, Tang X, Guo S, Zhang B, et al. Autophagy and Apoptosis of Porcine Ovarian Granulosa Cells During Follicular Development. *Animals (Basel)*. 2019; 10-9 (12): 1111.
- Sun C, Zhang F, Li X, Liu Y, Li Q, Li J, et al. Apoptosis induced by patulin in mouse primary Leydig cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial and endoplasmic reticulum stress signaling pathways. *Oncotarget*. 2010; 7 (29): 44992–5005.
- Rogova LN, Lipov DS, Tihaeva KJu, Muhina AV, Kornev AV, Churzin DA. Vliyanie sopushtvuyushhej ehkstragenital'noj patologii na uspešnost' procedur vspomogatel'nyh reproduktivnyh tehnologij u zhenshin (po dannym klinik Volgogradskoj oblasti). *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2023; (1): 92–96. Russian.
- Kogan IYu, Gzgzyan AM, Lesik EA. Protokoly stimulyatsii yaichnikov v ciklah EhKO: rukovodstvo dlya vrachej. M.: GEHOTAR-Media, 2020; 159 s. Russian.
- Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev*. 2009; 8 (7): 538–42.
- Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*. 2019; 16; 50 (4): 778–95.
- Oktay K, Rodriguez-Wallberg KA, Salgado-Moran G. The role of interleukin-8 in the physiology and pathophysiology of the reproductive system. *Human Reproduction Update*. 2019; 25 (4): 411–28.
- Zenkina VG. Znachenie apoptoza v yaichnikah pri razvitii nekotoryh zabolevanij reproduktivnoj sistemy. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2011; 6: 227–30. Russian.
- Chechina OE, Biktasova AK, Sazonova EV, Zhukova OB, Proxorenko TS, Krat IV, i dr. Rol' citokinov v redoks-zavisimoy regulyatsii apoptoza. *Byulleten' sibirskoj mediciny*. 2009; 2: 67–72. Russian.
- Yang Z, Hong W, Zheng K, Feng J, Hu C, Tan J, et al. Chitosan oligosaccharides alleviate H2O2-stimulated granulosa cell damage via HIF-1 α signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2022; 2022: 4247042.

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА И ИХ СВЯЗЬ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ IL6, IL8 И TNF α У ПАЦИЕНТОК С НАРУЖНЫМ ГЕНИТАЛЬНЫМ ЭНДОМЕТРИОЗОМ

Л. Н. Гуменюк , И. А. Земляная, Алмасуд Рами, Е. С. Бадула, А. Р. Исмаилов, Н. А. Сероштанов, С. С. Кокарева, А. А. Черемисова, Ю. Р. Купрейчук


Медицинская академия имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение ФГАОУ ВО «КФУ имени В. И. Вернадского»), Симферополь, Россия

Ассоциация микробиоты кишечника и наружного генитального эндометриоза (НГЭ) на сегодняшний день представляет собой особый научный интерес. Целью исследования было оценить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и изучить на уровне видов их взаимосвязь с показателями IL6, IL8 и TNF α в плазме крови у пациенток с НГЭ. В одномоментное сравнительное исследование было включено 50 пациенток с НГЭ (основная группа) и 50 здоровых женщин (контрольная группа). Оценивали изменения таксономического состава микробиоты кишечника и уровни IL6, IL8 и TNF α в плазме крови. У пациенток с НГЭ в таксономическом составе микробиоты кишечника обнаружены статистически значимое снижение представленности видов *Coprococcus catu* ($p = 0,009$), *Turicibacter sanguinis* ($p = 0,008$) и *Ruminococcus gnavus* ($p < 0,001$), повышение представленности видов *Eubacterium ramulus* ($p = 0,040$), *Bacterioides dorei* ($p = 0,001$), *Prevotella divia* ($p = 0,008$) и *Shigella flexneri* ($p < 0,001$). Выявлены статистически значимые корреляции показателя IL6 с представленностью *Turicibacter sanguinis* ($r = -0,92$; $p = 0,001$), IL8 и *Shigella flexneri* ($r = 0,72$; $p < 0,001$), TNF α с представленностью *Prevotella divia* ($r = 0,77$; $p = 0,001$). Полученные результаты дополняют имеющиеся литературные сведения о специфике изменений микробиоты кишечника и их сопряженности с некоторыми биомаркерами воспаления при НГЭ, что может стать обоснованием для продолжения исследований в этом направлении и, возможно, открывает новые подходы к лечению этого заболевания.

Ключевые слова: наружный генитальный эндометриоз, микробиота кишечника, IL6, IL8, TNF α

Вклад авторов: Л. Н. Гуменюк — замысел и дизайн исследования; И. А. Земляная, А. Рами, Н. А. Сероштанов — сбор, анализ и интерпретация данных; Е. С. Бадула, А. Р. Исмаилов — статистическая обработка данных; С. С. Кокарева, А. А. Черемисова, Ю. Р. Купрейчук — подготовка статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Крымской медицинской академии имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского» (протокол № 10 от 14 ноября 2021 г.), спланировано и проведено в соответствии с Хельсинской декларацией. Все лица, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

 **Для корреспонденции:** Леся Николаевна Гуменюк
бульвар Ленина, 5/7295006, г. Симферополь, Республика Крым, Россия; leya.sorokina@mail.ru

Статья получена: 16.05.2023 **Статья принята к печати:** 01.06.2023 **Опубликована онлайн:** 15.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.018

GUT MICROBIOTA ALTERATIONS AND THEIR ASSOCIATION WITH IL6, IL8 AND TNF α LEVELS IN PATIENTS WITH EXTERNAL GENITAL ENDOMETRIOSIS

Gumenyuk LN , Zemlyanaya IA, Rami Almasoud, Badula ES, Ismailov AR, Seroshtanov NA, Kokareva SS, Cheremisova AA, Kupreichyuk YuR

SI Georgievsky Medical Academy, VI Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

Today, the association of gut microbiota with external genital endometriosis (EGE) is of special scientific interest. The study was aimed to assess alterations of the gut microbiota taxonomic composition and explore their correlations with plasma levels of IL6, IL8 and TNF α at the species level in patients with EGE. The cross-sectional comparative study involved 50 patients with EGE (index group) and 50 healthy women (control group). The changes in the gut microbiota taxonomic composition and plasma levels of IL6, IL8 and TNF α were assessed. A significant decrease in the abundance of such species, as *Coprococcus catu* ($p = 0.009$), *Turicibacter sanguinis* ($p = 0.008$) and *Ruminococcus gnavus* ($p < 0.001$), along with the increase in the abundance of *Eubacterium ramulus* ($p = 0.040$), *Bacterioides dorei* ($p = 0.001$), *Prevotella divia* ($p = 0.008$) and *Shigella flexneri* ($p < 0.001$) were found in the gut microbiota taxonomic composition in patients with EGE. Significant correlations between the IL6 levels and the abundance of *Turicibacter sanguinis* ($r = -0.92$; $p = 0.001$), IL8 levels and the abundance of *Shigella flexneri* ($r = 0.72$; $p < 0.001$), TNF α levels and the abundance of *Prevotella divia* ($r = 0.77$; $p = 0.001$) were revealed. The findings add to the available literature data on the features of gut microbiota alterations and their association with some inflammation biomarkers in individuals with EGE, which can justify further research in this area and probably open up new approaches to treatment of the disease.

Keywords: external genital endometriosis, gut microbiota, IL6, IL8, TNF α .

Author contribution: Gumenyuk LN — study concept and design; Zemlyanaya IA, Rami A, Seroshtanov NA — data acquisition, analysis, and interpretation; Badula ES, Ismailov AR — statistical data processing; Kokareva SS, Cheremisova AA, Kupreichyuk YuR — manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the SI Georgievsky Medical Academy, VI Vernadsky Crimean Federal University (protocol № 10 of 14 November 2021), planned and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. The informed consent was obtained from all study participants.

 **Correspondence should be addressed:** Lesya N. Gumenyuk
Bulvar Lenina, 5/7295006, Simferopol, Republic of Crimea, Russia; leya.sorokina@mail.ru

Received: 16.05.2023 **Accepted:** 01.06.2023 **Published online:** 15.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.018

Эндометриоз является одной из значимых проблем современной гинекологии и остается предметом активного изучения на протяжении многих десятилетий. По совокупности данных, более 176 млн женщин в мире страдают эндометриозом [1], при этом в последние годы наблюдается его неуклонный рост. Важно отметить, что эндометриоз сопряжен с бесплодием

в 50–80% и хронической тазовой болью — в 50% [1, 2], существенно ухудшающих психосоматическое состояние и качество жизни пациенток [3]. Сложности дифференциальной диагностики эндометриоза часто приводят к задержке постановки диагноза на 4–11 лет, при этом 65% женщин ставят ошибочный диагноз [3, 4], что приводит к прогрессированию заболевания и тяжелым

последствиям [5]. Современные фармакологические и хирургические подходы к лечению эндометриоза сопряжены с риском значительных побочных эффектов и недостаточно эффективны, частота рецидивов остается высокой и достигает 15–21% [3]. Поэтому поиск новых патофизиологических механизмов наружного генитального эндометриоза (НГЭ) и безопасных эффективных способов профилактики и лечения этого заболевания остается актуальным.

НГЭ, характеризующийся разрастанием эктопической ткани эндометрия вне полости матки, классически рассматривают как хроническое эстрогензависимое иммунно-воспалительное заболевание, локально ограниченное областью таза [6]. Однако в настоящее время НГЭ все чаще признают воспалительным системным заболеванием, нередко ассоциированным с гетерогенной полиорганной дисфункцией [3, 7]. Считается, что в патофизиологии синдрома системной воспалительной реакции при НГЭ существенную роль играет абберантное продуцирование цитокинов, сопровождающееся дисрегуляцией иммунного ответа. При этом одними из наиболее значимых считают провоспалительные интерлейкины (IL6, IL8), фактор некроза опухоли альфа (TNF α). Оценка цитокинового профиля крови у пациенток с НГЭ позволила обнаружить повышенные уровни IL6, IL8 и TNF α [8–10]. Кроме этого, повышенный уровень IL6 в плазме был связан с выраженностью болевого синдрома [11], тяжестью заболевания [12] и частотой рецидивов [11] у пациенток с НГЭ. В то время как для уровня IL8 в плазме выявлена ассоциация с размером и количеством активных поражений [13] и бесплодием [14], для TNF α — с выраженностью клинических проявлений, активностью и степенью распространенности НГЭ [15].

Современные исследования свидетельствуют о вовлеченности микробиоты кишечника в патофизиологию НГЭ, что можно объяснить ее фундаментальной ролью в поддержании иммунного гомеостаза и непосредственной сопряженностью с развитием многочисленных воспалительных заболеваний [16]. В экспериментах на мышинной модели гетерологичного инъекционного и хирургического эндометриоза было показано, что микробиота кишечника влияет на развитие и прогрессирование НГЭ [17, 18] посредством модуляции различных звеньев иммунной системы [18]. В частности, введение фекальной нормальной микробиоты мышам с индуцированным эндометриозом и истощением микробиоты кишечника было связано с уменьшением роста эндометриоидных поражений, в то время как введение фекальной микробиоты мышам с эндометриозом приводило к прогрессированию заболевания. Кроме того, истощение кишечных бактерий снижает интенсивность воспалительной реакции, ассоциированной с эндометриозом [17] и модулирует численность иммунных клеток в перитонеуме [18]. Наконец, в работах представлены убедительные доказательства об изменении профиля микробиоты кишечника у мышам [18–20] и людей [18, 19]. В то же время клинические

данные о видовом составе микробиоты кишечника у пациенток с НГЭ носят фрагментарный и противоречивый характер, недостаточны для однозначных выводов. Так, из 16 исследований, посвященных изучению взаимосвязи между НГЭ и микробиомом, только в шести анализировали микробиоту кишечника и лишь четыре работы были проведены на микробиоме кишечника человека [23]. Важно также отметить, что в числе представленных работ отсутствуют исследования, посвященные изучению изменений микробиоты кишечника среди пациенток с НГЭ славянского этноса. В том числе имеются лишь единичные сведения о взаимосвязи между микробиотой кишечника и воспалительными биомаркерами у пациенток с НГЭ.

Цель исследования — оценить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и изучить на уровне видов их взаимосвязь с показателями IL6, IL8 и TNF α в плазме крови у пациенток с НГЭ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Сравнительное одномоментное исследование выполнено на базе Клинического многопрофильного центра Святого Луки (г. Симферополь, Республика Крым). В исследование было включено 50 госпитализированных в гинекологическое отделение пациенток в возрастном диапазоне 18–45 лет с подтвержденным НГЭ I–IV (основная группа) и 50 здоровых женщин, сопоставимых по возрасту, проходивших профилактический медицинский осмотр (контрольная группа). Все пациентки с НГЭ и здоровые женщины подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения пациенток в основную группу: возраст 18–45 лет; наличие лапароскопически и гистологически верифицированного диагноза НГЭ.

Критерии невключения пациенток в основную группу: возраст < 18 или > 45 лет; индекс массы тела >24,9 кг/м²; беременность и период лактации; наличие сахарного диабета I и II типа, коморбидной хронической системной и соматической патологии; наличие в анамнезе психических и поведенческих расстройств; наличие верифицированных функциональных и воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарной системы; наличие в анамнезе в предшествующий исследованию месяц инфекционных заболеваний; наличие в анамнезе в предшествующий исследованию месяц нарушения стула (запоры/диарея); прием в предшествующие три месяца до включения в исследование гормональных, оральных, контрацептивных и противовоспалительных средств, антибактериальных пробиотических, пребиотических, противовирусных, симбиотических или кислотоподавляющих средств; прием в предшествующие восемь недель до включения в исследование средств, оказывающих влияние на стул; отказ от участия в исследовании.

Критерии включения пациенток в контрольную группу: возраст от 18 до 45 лет; индекс массы тела < 24,9 кг/м²; отсутствие соматических заболеваний и аллергических

Таблица 1. Характеристика пациенток с наружным генитальным эндометриозом и здоровых женщин

Показатель	Пациентки с НГЭ (n = 50)	Контрольная группа (n = 50)
Средний возраст, годы, медиана [25%; 75%]	37,0 [32,0; 44,0]	37,7 [32,7; 43,2]
Индекс массы тела, кг/м ² , медиана [25%; 75%]	23,0 [21,0; 24,3]	22,06 [20,8; 24,1]
НГЭ I–II степени распространенности, n (%)	14 (28,0%)	–
НГЭ III–IV степени распространенности, n (%)	36 (70,0%)	–

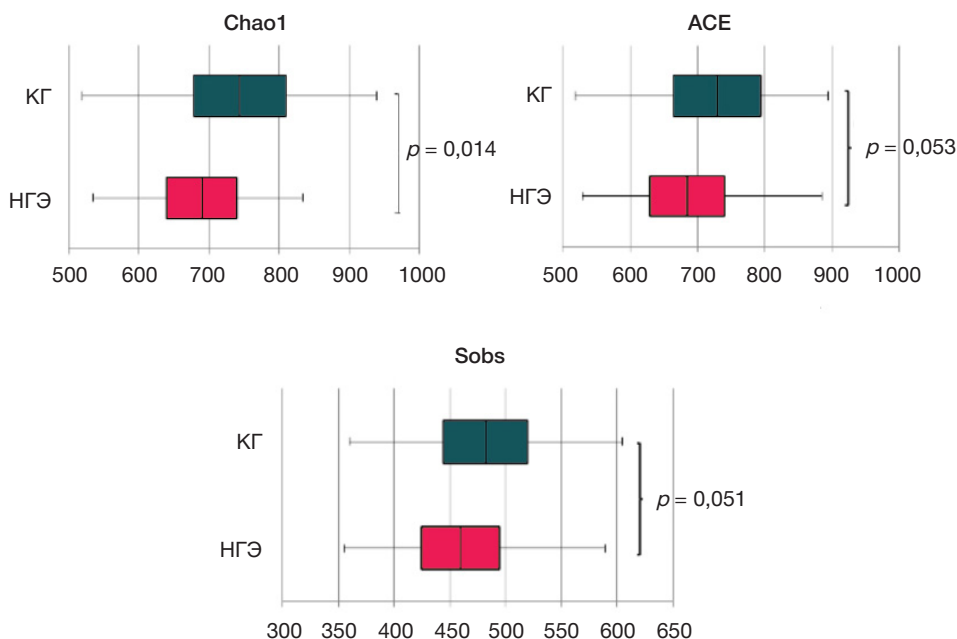


Рис. 1. Филогенетический состав микробиоты кишечника у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) и здоровых женщин. КГ — контрольная группа

реакций; отсутствие в предшествующие два месяца до включения в исследование инфекционных и острых заболеваний; отсутствие в анамнезе психических и поведенческих расстройств; отсутствие в предшествующий месяц до включения в исследование нарушений стула (запоры/диарея); отсутствие в предшествующие три месяца до включения в исследование приема гормональных, оральных, контрацептивных и противовоспалительных средств, антибактериальных пробиотических, пребиотических, противовирусных, симбиотических или кислотоподавляющих средств; отсутствие приема в предшествующие восемь недель до включения в исследование средств, оказывающих влияние на стул.

Критерии невключения пациенток в контрольную группу: наличие температуры тела выше 36,9 °С.

Характеристика пациенток с НГЭ и КГ представлена в табл. 1. Группы были сопоставимы по возрасту ($p = 0,94$; χ^2) и индексу массы тела ($p = 0,052$; χ^2). У 36 (70,0%) пациенток НГЭ соответствовал III–IV степени распространенности.

Диагноз эндометриоза был верифицирован интраоперационно согласно критериям классификации Американского общества по репродуктивной медицине (ASRM).

С целью анализа таксономического состава микробиоты кишечника у пациенток с НГЭ и здоровых женщин образцы кала брали утром (с 8.00 до 11.00), при этом у пациенток с НГЭ — в день госпитализации. Образцы кала замораживали и хранили в одноразовых пластиковых контейнерах при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения метагеномного анализа. Ассигнование тотальной

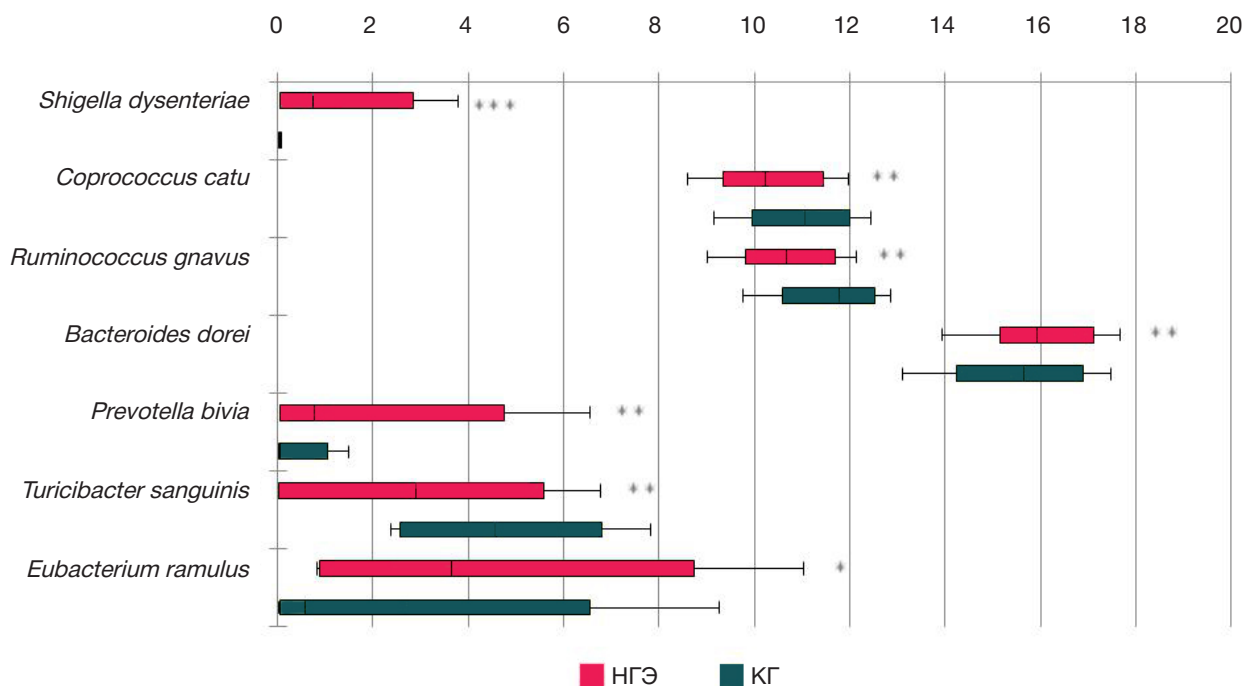


Рис. 2. Видовой состав микробиоты кишечника у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) и здоровых женщин. КГ — контрольная группа

Таблица 2. Сравнительный анализ показателей IL6, IL8 и TNF α в плазме крови у пациенток с наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) и здоровых женщин. КГ — контрольная группа; p — статистическая значимость различий между показателями в группе пациенток с НГЭ и КГ

Показатель	Пациентки с НГЭ ($n = 50$)	Контрольная группа ($n = 50$)	P
IL6, пг/мл, медиана [25%; 75%]	14,7 [8,1; 18,3]	3,8 [2,0; 6,6]	< 0,001
IL8, пг/мл, медиана [25%; 75%]	14,6 [9,6; 28,8]	2,2 [1,4; 6,8]	< 0,001
TNF α , пг/мл, медиана [25%; 75%]	17,9 [9,3; 26,5]	5,2 [2,8; 7,6]	< 0,001

ДНК проводили методом фенольной экстракции; нуклеотидную последовательность ДНК устанавливали с использованием высокопроизводительного секвенатора SOLiD5500 Wildfire (AppliedBiosystems; США) методом шотгансеквенирования [24].

Фильтрацию прочтений по качеству и их таксономическую классификацию проводили с использованием программного обеспечения QIIME версии 1.9.1 [25]. Таксономическую принадлежность прочтений осуществляли на основе информации двух таксономических баз данных: на 1-ом этапе выполняли подбор референсного блока операционных таксономических единиц (OTE) бактерий на основании сравнения полученных прочтений генов 16S рПНК с базой данных GreenGenes версии 13.5 [26]. На 2-ом этапе идентификацию таксономической принадлежности данных OTE проводили на основе специализированной базы данных кишечной микробиоты человека HITdb с использованием алгоритма RDP [27].

Оценку качественного и количественного состава микробиоты кишечника проводили на основе идентификации видов, родов и фил микроорганизмов; α -разнообразию сообщества оценивали посредством расчета индекса Chao1, показателя числа обнаруженных таксонов (Sobs), индекса, оценивающего реальное количество таксонов (ACE) с помощью программы Mothur v.1.22.0 (<http://www.mothur.org>).

У пациенток с НГЭ и здоровых добровольцев забор крови для иммуноферментного анализа осуществляли путем венопункции утром, натощак, в состоянии покоя (15 мин минимум). Оценивали показатели IL6, IL8 и TNF α в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью тест-системы «Вектор-Бест»; Новосибирск, Россия). Пробирки с сывороткой крови хранили в замороженном состоянии при температуре -20 °C.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc.; США). Для количественных показателей определяли характер распределения с использованием метода Колмогорова–Смирнова. Ввиду того что большинство количественных признаков не соответствовало нормальному распределению, вычисляли медиану (Me) и интерквартильный диапазон (25-й процентиль; 75-й процентиль). Для качественных признаков определяли долю и абсолютное количество значений. Для сравнения качественных признаков использовали критерий χ^2 , для сравнения количественных признаков — критерий Манна–Уитни. Для оценки взаимосвязи между факторами проводили ранговый корреляционный анализ по Спирмену. Уровень значимости при сравнении качественных и количественных признаков, а также при проведении корреляционного анализа соответствует значениям $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке таксономического состава микробиоты кишечника у пациенток с НГЭ в сравнении со здоровыми

женщинами было обнаружено статистически значимое снижение α -разнообразия бактериального сообщества (индекс Chao1 $p = 0,014$). Кроме того, у пациенток с НГЭ в сравнении со здоровыми женщинами отмечалось снижение индексов ACE и Sobs, без статистически значимых различий между группами ($p = 0,053$; $p = 0,051$ соответственно) (рис. 1).

В ходе сравнительного анализа видового состава кишечной микробиоты у пациенток с НГЭ в сравнении со здоровыми женщинами зафиксировано статистически значимое снижение численности *Coprococcus catu* ($p = 0,009$), *Ruminococcus gnavus* ($p < 0,001$) и *Turicibacter sanguinis* ($p = 0,008$) и повышение численности бактерий вида *Eubacterium ramulus* ($p = 0,040$), *Bacterioides dorei* ($p = 0,001$), *Prevotella divia* ($p = 0,008$) и *Shigella flexneri* ($p < 0,001$) (рис. 2).

Уровни IL6, IL8 и TNF α в плазме крови пациенток с НГЭ были статистически значимо выше в сравнении с показателями здоровых женщин (табл. 2).

При этом нами выявлена обратная тесная корреляция численности *Turicibacter sanguinis* с показателем IL6 ($r = -0,92$; $p = 0,001$); прямая высокая статистически значимая корреляция между повышением численности бактерий рода *Shigella flexneri* и показателем IL8 ($r = 0,72$; $p < 0,001$). Кроме того, была зафиксирована прямая высокая корреляция показателя TNF α с численностью *Prevotella divia* ($r = 0,77$; $p = 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микробиота кишечника сопряжена со многими воспалительными заболеваниями, включая НГЭ [16–19]. Тем не менее, на сегодняшний день выполнены единичные исследования по этой теме на людях, результаты которых не позволяют сделать консенсусных выводов. Исходя из недостаточной изученности этого вопроса первой задачей нашего исследования стало уточнение изменений таксономического состава микробиоты кишечника в группе пациенток с НГЭ. Проведенное исследование подтвердило, что состав микробиоты кишечника у пациенток с НГЭ значительно отличается от такового у здоровых женщин. По нашим данным, для пациенток с НГЭ по сравнению со здоровыми женщинами характерно более низкое бактериальное α -разнообразие, что является общей отличительной чертой хронических воспалительных заболеваний [28]. Полученные нами результаты соотносятся с данными ранее выполненного исследования [22], но не подтверждают другие данные [21], согласно которым для пациенток с НГЭ было характерно снижение как α -разнообразия, так и β -разнообразия. Результаты настоящего исследования также показали, что у пациенток с НГЭ дисбиотические изменения кишечника характеризуются снижением численности бактерий с иммуномодулирующим потенциалом — представителей вида *Coprococcus catu* и *Turicibacter sanguinis*, которые, как известно, являются продуцентами короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), т. е. ключевых эндогенных

сигнальных молекул поддержания иммунологического гомеостаза хозяина и *Ruminococcus gnavus*. Кроме того, снижение КЦЖК влечет за собой увеличение числа грамотрицательных бактерий и соответственно липополисахарида (ЛПС) [29]. Есть данные, что у мышей с эндометриозом фекалии содержат сниженное количество КЦЖК, в частности бутирата, в то время как введение бутирата ингибирует рост эндометриоидных клеток в исследованиях *in vitro* и *in vivo* посредством ингибирования активности гистондеацетилазы и активизации экспрессии белка Rap1GAP, который инактивирует внутриклеточный сигнальный белок Rap1 [19]. Вместе с тем нами идентифицирована повышенная численность бактерий вида *Eubacterium ramulus*, *Bacterioides dorei*, *Prevotella divia* и *Shigella flexneri*. Среди них стоит отметить наличие *Shigella flexneri*, которые ранее были обнаружены в образцах фекалий пациенток с НГЭ III–IV степени распространенности в исследовании [30]. Предполагается роль данного вида как триггера инициации иммунологических изменений, приводящих к развитию и прогрессированию эндометриоза [31]. Полученные нами результаты частично соотносятся с данными ряда других работ. Например, в одном из исследований для пациенток с НГЭ было характерно снижение численности бактерий *Coprococcus* и повышение численности *Bacterioides* [21]. В другой работе для пациенток с НГЭ было характерно повышение численности *Eubacterium* и *Bacterioides* [22]. Несогласованность полученных данных может быть обусловлена тем, что, во-первых, исследования выполняли с участием пациенток различной этнической принадлежности, а во-вторых, в отличие от вышеуказанных авторов, мы не включали пациенток с НГЭ с избыточной массой тела (так как доказано влияние этого фактора на изменения микробиоты кишечника), а также пациенток, принимающих гормональные, контрацептивные и противовоспалительные препараты для исключения их влияния на результаты работы.

Как указывалось ранее, у пациенток с НГЭ обнаруживаются значительно повышенные уровни IL6, IL8 и TNF α в плазме крови, роль которых в развитии и прогрессировании тяжести заболевания доказана [8–10]. В своем исследовании мы тоже установили статистически значимо более высокие плазменные показатели IL6, IL8 и TNF α у пациенток с НГЭ в сравнении со здоровыми женщинами. Между тем дисбиоз кишечника, который все чаще признается одним из факторов развития воспаления, а также аутоиммунных и иммуноопосредованных заболеваний, способен запускать формирование иммуно-воспалительного ответа с увеличением уровня провоспалительных цитокинов на системном уровне [32]. Поэтому второй задачей исследования была оценка взаимосвязи изменений таксономического состава микробиоты кишечника на уровне видов с уровнями IL6, IL8 и TNF α в плазме в группе пациенток с НГЭ. Нами установлено, что некоторые виды микроорганизмов кишечника у пациенток с НГЭ сопряжены с уровнями изучаемых цитокинов в плазме, что может указывать на наличие сопряженности состава микробиоты кишечника с НГЭ. В частности, была выявлена обратная ассоциация между повышением уровня IL6 и численности бактерий *Turicibacter sanguinis*. В литературе нами было найдено возможное объяснение данной зависимости. Как известно, бактерии *Turicibacter* участвуют в образовании метаболитов с протективным эффектом по отношению к эпителию кишечника и репродуктивной системе,

а именно таких КЦЖК, как уксусная, валериановая и масляная кислоты. Снижение уровня последней приводит к активации гистондеацетилазы, связанного с ней транскрипционного ядерного фактора NF- κ B и ингибированию G-белковых рецепторов GPR41, GPR43 и GPR109A, что вызывает экспрессию генов, определяющих синтез провоспалительных цитокинов, включая IL6 [33], и способствует развитию хронического воспаления [16]. Отмеченная ранее [34] сопряженность показателя IL8 с численностью бактерий рода *Subdoligranulum* у пациенток с НГЭ в настоящем исследовании не была подтверждена. По полученным нами данным, для пациенток с НГЭ характерна прямая ассоциация показателя IL8 с численностью бактерий *Shigella flexneri*, что может быть опосредовано способностью последней посредством инициирования паттерн-распознающих рецепторов TLR4 вызывать стойкую активацию ингибиторного киназного комплекса транскрипционного фактора NF- κ B (IKK) и последующую деградацию I- κ B, что, в свою очередь, способствует высвобождению NF- κ B с дальнейшей транслокацией в ядро и запуском транскрипции IL8 [35]. В литературе нами были найдены подобные ассоциации у пациентов с подтвержденной инфекцией шигеллеза, что подтверждали прямые тесные корреляции представленности *Shigella flexneri* с уровнем IL8 в плазме [36]. Контрастирование полученных нами данных с результатами сравниваемой работы, как мы уже указали, возможно, обусловлено различиями в дизайне, а именно избирательным включением в наше исследование пациенток с НГЭ, имеющих нормальный индекс массы тела и без коморбидных экстрагенитальных заболеваний, в то время как в другом исследовании [34] эти характеристики не являлись критериями исключения. Кроме того, различие может быть связано с тем, что мы включали в исследование пациенток с I–IV степенью распространенности НГЭ, в то время как в исследовании [34] приняли участие пациентки с III–IV степенью распространенности НГЭ. Этот факт тоже мог повлиять на отличия ассоциаций IL8 с представителями микробиоты кишечника у пациенток с НГЭ от имеющихся в литературе. Необходимо также отметить малый размер выборки (12 пациенток) в ранее описанном исследовании [34]. Кроме того, в своей работе мы обнаружили прямую высокую связь между уровнем в крови TNF α и численностью *Prevotella divia*. В доступной нам литературе мы не встретили работ, авторы которых изучали этот вопрос при НГЭ. Вместе с тем ранее показано, что обработка клеточной линии моноцитов ЛПС *Prevotella* приводит к одновременной активации трех базовых сигнальных путей митоген-активированной протеинкиназы (MAPK) (внеклеточной сигнальной киназы 1/2 (ERK1/2), с-Jun N-концевой киназы 1/2 (JNK1/2) и p38) с последующим индуцированием экспрессии мРНК TNF α и стимуляцией секреции TNF α [37].

Результаты настоящего исследования позволяют предположить значимую роль микробиоты кишечника в иммуногенезе НГЭ. По-видимому, причинно-следственные связи между микробиотой кишечника и уровнем провоспалительных цитокинов в крови при НГЭ требуют более детальной проработки и продолжения исследований в этом направлении.

ВЫВОДЫ

У пациенток с НГЭ обнаружены значительные нарушения представленности и таксономического состава

микробиоты кишечника. Кроме того, выявленные нами статистически значимые корреляции некоторых видов бактерий с уровнями IL6, IL8 и TNF α в плазме указывают на наличие связи между представленностью и составом микробиоты кишечника с иммунопатогенезом НГЭ.

Необходимо проведение дальнейших исследований для подтверждения роли микробиоты кишечника в патофизиологии НГЭ. Прицельное воздействие на микробиоту кишечника может способствовать повышению эффективности терапевтических подходов в лечении НГЭ.

Литература

- Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018; 4: 9.
- Saunders PTK, Horne AW. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell*. 2021; 184 (11): 2807–24.
- Bao C, Wang H, Fang H. Genomic Evidence Supports the Recognition of Endometriosis as an Inflammatory Systemic Disease and Reveals Disease-Specific Therapeutic Potentials of Targeting Neutrophil Degranulation. *Front Immunol*. 2022; 23 (13): 758440.
- Greene R, Stratton P, Cleary SD, Ballweg ML, Sinai N. Diagnostic experience among 4,334 women reporting surgically diagnosed endometriosis. *Fertility and sterility*. 2009; 91 (1): 32–39.
- Greenbaum H, Bat-El L, Galper BEL, Decter DH, Eisenberg VH. Endometriosis and autoimmunity: Can autoantibodies be used as a non-invasive early diagnostic tool? *Autoimmun Rev*. 2021; 20 (5): 102795.
- Clement Philip B. The Pathology of Endometriosis: A Survey of the Many Faces of a Common Disease Emphasizing Diagnostic Pitfalls and Unusual and Newly Appreciated Aspects. *Advances in Anatomic Pathology*. 2007; 14 (4): 241–60.
- Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *Lancet*. 2021; 27: 839–52.
- Ярмолинская М. И. Цитокиновый профиль перитонеальной жидкости и периферической крови больных с наружным генитальным эндометриозом. *Журнал акушерства и женских болезней*. 2008; 57 (3): 30–34.
- Sikora J, Smycz-Kubańska M, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation — the role of IL8 in pathogenesis of endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2017; 77 (4).
- Cameron MJ, Kelvin DJ. Cytokines and chemokines — their receptors and their genes: an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2003; 520: 8–32.
- Somigliana E, Viganò P, Tirelli AS, Felicetta I, Torresani E, Vignali M, et al. Use of the concomitant serum dosage of CA 125, CA 19-9 and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions. *Human Reproduction*. 2004; 19 (8): 1871–6.
- Dong Hao Lu, Song H, Shi G. Anti-TNF α treatment for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane database of systematic reviews*. 2010; 3 (3): CD008088.
- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of Immunology*. 2003; 170 (6): 3369–76.
- Malvezzi H, Hernandez C, Piccinato CA, Podgaec S. Interleukin in endometriosis-associated infertility-pelvic pain: systematic review and meta-analysis. *Reproduction*. 2019; 158 (1): 1–12.
- Scholl B, Bersinger NA, Kuhn A. Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis. *Gynecol Endocrinol*. 2009; 25 (11): 701–6.
- Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012; 3 (1): 4–14.
- Chadchan SB, Cheng M, Parnell LA, Yin Y, Schriefer A, Mysorekar IU, et al. Antibiotic therapy with metronidazole reduces endometriosis disease progression in mice: a potential role for gut microbiota. *Hum Reprod*. 2019; 34: 1106–16.
- Chadchan SB, Naik SK, Popli P, et al. Gut microbiota and microbiota-derived metabolites promotes endometriosis. *Cell Death Discov*. 2023; 9: 28.
- Chadchan SB, Popli P, Ambati CR, Tycksen E, Han SJ, Bulun SE, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids protect against the progression of endometriosis. *Life Sci Alliance*. 2021; 30; 4 (12): e202101224.
- Ni Z, Sun S, Bi Y, Ding J, Cheng W, Yu J, et al. Correlation of fecal metabolomics and gut microbiota in mice with endometriosis. *Am J Reprod Immunol*. 2020; 84: e13307.
- Svensson A, Brunkwall L, Roth B, Orho-Melander M, Ohlsson B. Associations Between Endometriosis and Gut Microbiota. *Reprod Sci*. 2021; 28 (8): 2367–77.
- Chen S, Gu Z, Zhang W, Jia S, Wu Y, Zheng P, et al. The study of endometriosis and adenomyosis related microbiota in female lower genital tract in Northern Chinese population. *Gynecology and Obstetrics Clinical Medicine*. 2021; 1 (3): 119–29.
- Ser H-L, Au Yong S-J, Shafiee MN, Mokhtar NM, Ali RAR. Current updates on the role of microbiome in endometriosis: a narrative review. *Microorganisms*. 2023; 11 (2): 360.
- Mitra S, Förster-Fromme K, Damms-Machado A, Scheurenbrand T, Biskup S, Huson, DH, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013; 14 (5): 16.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimerachecked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72: 5069–72.
- Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1056.
- Vallejo V, Ilagan JG. A Postpartum Death Due to Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in the United States. *ObstetGynecol*. 2020; 136 (1): 52–55.
- Kumari R, Ahuja V, Jaishree P. Fluctuations in butyrate-producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India. *World J Gastroenterol*. 2013; 19: 3404–14.
- Ata B, Yildiz S, Turkgeldi E, Brocal VP, Dinleyici EC, Moya A, et al. The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 2204.
- Kodati VL, Govindan S, Movva S, Ponnala S, Hasan Q. Role of Shigella infection in endometriosis: a novel hypothesis. *Med Hypotheses*. 2008; 70 (2): 239–43.
- Гуменюк Л. Н., Голод М. В., Силаева Н. В., Сорокина Л. Е., Ильясов С. С., Андрощук Н. А. и др. Изменения микробиоты кишечника и их связь с тяжестью заболевания и некоторыми показателями цитокинового профиля у пациентов с COVID-19. *Вестник РГМУ*. 2022; 1: 23–30.
- Liu P, Gao M, Liu Z, Zhang Y, Tu H, Lei L, et al. Gut microbiome composition linked to inflammatory factors and cognitive functions in first-episode, drug-naïve major depressive disorder patients. *Front Neurosci*. 2022; 28 (15): 800764.
- Shan J, Ni Z, Cheng W, Zhou L, Zhai D, Sun S, et al. Gut microbiota imbalance and its correlations with hormone and inflammatory factors in patients with stage 3/4 endometriosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2021; 304: 1363–73.
- Philpott DJ, Yamaoka S, Israël A, Sansonetti PJ. Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL8 expression in epithelial cells. *J Immunol*. 2000; 165 (2): 903–14.

36. Raqib R, Wretling B, Andersson J, Lindberg AA. Cytokine secretion in acute shigellosis is correlated to disease activity and directed more to stool than to plasma. *J Infect Dis.* 1995; 171: 376–384.
37. Kim SJ, Choi EY, Kim EG, Shin SH, Lee JY, Choi JI, et al.

Prevotella intermedia lipopolysaccharide stimulates release of tumor necrosis factor-alpha through mitogen-activated protein kinase signaling pathways in monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 51 (2): 407–13.

References

1. Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Viganò P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4: 9.
2. Saunders PTK, Horne AW. Endometriosis: Etiology, pathobiology, and therapeutic prospects. *Cell.* 2021; 184 (11): 2807–24.
3. Bao C, Wang H, Fang H. Genomic Evidence Supports the Recognition of Endometriosis as an Inflammatory Systemic Disease and Reveals Disease-Specific Therapeutic Potentials of Targeting Neutrophil Degranulation. *Front Immunol.* 2022; 23 (13): 758440.
4. Greene R, Stratton P, Cleary SD, Ballweg ML, Sinaii N. Diagnostic experience among 4,334 women reporting surgically diagnosed endometriosis. *Fertility and sterility.* 2009; 91 (1): 32–39.
5. Greenbaum H, Bat-El L, Galper BEL, Decter DH, Eisenberg VH. Endometriosis and autoimmunity: Can autoantibodies be used as a non-invasive early diagnostic tool? *Autoimmun Rev.* 2021; 20 (5): 102795.
6. Clement Philip B. The Pathology of Endometriosis: A Survey of the Many Faces of a Common Disease Emphasizing Diagnostic Pitfalls and Unusual and Newly Appreciated Aspects. *Advances in Anatomic Pathology.* 2007; 14 (4): 241–60.
7. Taylor HS, Kotlyar AM, Flores VA. Endometriosis is a chronic systemic disease: clinical challenges and novel innovations. *Lancet.* 2021; 27: 839–52.
8. Yarmolinskaya MI. Citokinovyi profil' peritoneal'noy zhidkosti i perifericheskoy krovi bol'nyh s naruzhnym genital'nym ehndometriozom. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney.* 2008; 57 (3): 30–34. Russian.
9. Sikora J, Smycz-Kubarńska M, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Abnormal peritoneal regulation of chemokine activation — the role of IL8 in pathogenesis of endometriosis. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2017; 77 (4).
10. Cameron MJ, Kelvin DJ. Cytokines and chemokines — their receptors and their genes: an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2003; 520: 8–32.
11. Somigliana E, Viganò P, Tirelli AS, Felicetta I, Torresani E, Vignali M, et al. Use of the concomitant serum dosage of CA 125, CA 19-9 and interleukin-6 to detect the presence of endometriosis. Results from a series of reproductive age women undergoing laparoscopic surgery for benign gynaecological conditions. *Human Reproduction.* 2004; 19 (8): 1871–6.
12. Dong Hao Lu, Song H, Shi G. Anti-TNF α treatment for pelvic pain associated with endometriosis. *Cochrane database of systematic reviews.* 2010; 3 (3): CD008088.
13. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *Journal of Immunology.* 2003; 170 (6): 3369–76.
14. Malvezzi H, Hernandez C, Piccinato CA, Podgaec S. Interleukin in endometriosis-associated infertility-pelvic pain: systematic review and meta-analysis. *Reproduction.* 2019; 158 (1): 1–12.
15. Scholl B, Bersinger NA, Kuhn A. Correlation between symptoms of pain and peritoneal fluid inflammatory cytokine concentrations in endometriosis. *Gynecol Endocrinol.* 2009; 25 (11): 701–6.
16. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes.* 2012; 3 (1): 4–14.
17. Chadchan SB, Cheng M, Parnell LA, Yin Y, Schriefer A, Mysorekar IU, et al. Antibiotic therapy with metronidazole reduces endometriosis disease progression in mice: a potential role for gut microbiota. *Hum Reprod.* 2019; 34: 1106–16.
18. Chadchan SB, Naik SK, Popli P, et al. Gut microbiota and microbiota-derived metabolites promotes endometriosis. *Cell Death Discov.* 2023; 9: 28.
19. Chadchan SB, Popli P, Ambati CR, Tycksen E, Han SJ, Bulun SE, et al. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids protect against the progression of endometriosis. *Life Sci Alliance.* 2021; 30; 4 (12): e202101224.
20. Ni Z, Sun S, Bi Y, Ding J, Cheng W, Yu J, et al. Correlation of fecal metabolomics and gut microbiota in mice with endometriosis. *Am J Reprod Immunol.* 2020; 84: e13307.
21. Svensson A, Brunkwall L, Roth B, Orho-Melander M, Ohlsson B. Associations Between Endometriosis and Gut Microbiota. *Reprod Sci.* 2021; 28 (8): 2367–77.
22. Chen S, Gu Z, Zhang W, Jia S, Wu Y, Zheng P, et al. The study of endometriosis and adenomyosis related microbiota in female lower genital tract in Northern Chinese population. *Gynecology and Obstetrics Clinical Medicine.* 2021; 1 (3): 119–29.
23. Ser H-L, Au Yong S-J, Shafiee MN, Mokhtar NM, Ali RAR. Current updates on the role of microbiome in endometriosis: a narrative review. *Microorganisms.* 2023; 11 (2): 360.
24. Mitra S, Förster-Fromme K, Damms-Machado A, Scheurenbrand T, Biskup S, Huson, DH, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics.* 2013; 14 (5): 16.
25. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010; 7 (5): 335–6.
26. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N. Greengenes, a chimerachecked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 5069–72.
27. Ritari J, Salojärvi J, Lahti L, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics.* 2015; 16 (1): 1056.
28. Vallejo V, Ilagan JG. A Postpartum Death Due to Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in the United States. *ObstetGynecol.* 2020; 136 (1): 52–55.
29. Kumari R, Ahuja V, Jaishree P. Fluctuations in butyrate-producing bacteria in ulcerative colitis patients of North India. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 3404–14.
30. Ata B, Yildiz S, Turkgeldi E, Brocal VP, Dinleyici EC, Moya A, et al. The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 2204.
31. Kodati VL, Govindan S, Movva S, Ponnala S, Hasan Q. Role of Shigella infection in endometriosis: a novel hypothesis. *Med Hypotheses.* 2008; 70 (2): 239–43.
32. Gumenyuk LN, Golod MV, Silaeva NV, Sorokina LE, Ilyasov SS, Androschuk NA, et al. Gut microbiota alterations and their relationship to the disease severity and some cytokine profile indicators in patients with COVID-19. *Bulletin of RSMU.* 2022; 1: 22–9.
33. Liu P, Gao M, Liu Z, Zhang Y, Tu H, Lei L, et al. Gut microbiome composition linked to inflammatory factors and cognitive functions in first-episode, drug-naive major depressive disorder patients. *Front Neurosci.* 2022; 28 (15): 800764.
34. Shan J, Ni Z, Cheng W, Zhou L, Zhai D, Sun S, et al. Gut microbiota imbalance and its correlations with hormone and inflammatory factors in patients with stage 3/4 endometriosis. *Arch Gynecol Obstet.* 2021; 304: 1363–73.
35. Philpott DJ, Yamaoka S, Israël A, Sansonetti PJ. Invasive Shigella flexneri activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL8 expression in epithelial cells. *J Immunol.* 2000; 165 (2): 903–14.
36. Raqib R, Wretling B, Andersson J, Lindberg AA. Cytokine secretion in acute shigellosis is correlated to disease activity and directed more to stool than to plasma. *J Infect Dis.* 1995; 171: 376–384.
37. Kim SJ, Choi EY, Kim EG, Shin SH, Lee JY, Choi JI, et al. *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide stimulates release of tumor necrosis factor-alpha through mitogen-activated protein kinase signaling pathways in monocyte-derived macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007; 51 (2): 407–13.

РЕДКИЙ СЛУЧАЙ СОЧЕТАНИЯ ТРИХОРИНОФАЛАНГЕАЛЬНОГО СИНДРОМА И СИНДРОМА МАЙЕРА–РОКИТАНСКОГО–КЮСТЕРА–ХАУЗЕРА

З. К. Батырова [✉], А. С. Большакова, З. Х. Кумыкова, Д. А. Круглыак, Е. В. Уварова, В. Д. Чупрынин, Ф. Ш. Мамедова, И. О. Саделов, Д. Ю. Трофимов

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

Выделяют два варианта синдрома Майера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера (МРКХ): тип I, при котором наблюдается изолированная аплазия матки и влагалища, и тип II, при котором имеют место сопутствующие экстрагенитальные пороки развития, в рамках некоторых синдромальных состояний. Синдром Лангера–Гидеона или трихоринофалангеальный синдром (TRPS) — редкое ауточномно-доминантное заболевание, характеризующееся лицевым дисморфизмом и аномалиями кожи, ногтей и волос. Выделяют два типа трихоринофалангеального синдрома: TRPSI, обусловленный патогенным вариантом гена TRPS1, и TRPSII, обусловленный делецией с вовлечением генов TRPS1, RAD21 и EXT. Как правило, пороки развития половых органов встречаются при типе II. Представлено клиническое наблюдение TRPSII в сочетании с МРКХ. Отсроченная диагностика порока развития половых органов привела к длительному болевому синдрому у пациентки с крайне отягощенным анамнезом и проведению неоднократных хирургических вмешательств. Своевременное обнаружение сочетания аномалий половых органов у девочек с TRPS позволяет не только установить диагноз, но и оказать квалифицированную помощь с участием гинеколога детей и подростков, с целью минимизации возможных осложнений.

Ключевые слова: трихоринофалангеальный синдром, аномалия мочеполювых органов, МРКХ-синдром

Благодарности: Sonia R. Grover из Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital за помощь в формулировке концепции рукописи, А. В. Асатурову, заведующему 1-м патологоанатомическим отделением ФГБУ НМИЦАГП им. В. И. Кулакова, за помощь в редактировании рукописи.

Вклад авторов: З. К. Батырова, А. С. Большакова — концепция; З. К. Батырова, Д. А. Круглыак, Е. В. Уварова, В. Д. Чупрынин, Ф. Ш. Мамедова — сбор и обработка материала; З. К. Батырова, А. С. Большакова, З. Х. Кумыкова — написание текста; З. Х. Кумыкова, И. О. Саделов, Д. Ю. Трофимов — редактирование.

✉ **Для корреспонденции:** Залина Кимовна Батырова
ул. Толбухина, д. 3/2, к. 59, г. Москва, 121596, Россия; linadoctor@mail.ru

Статья получена: 17.06.2023 **Статья принята к печати:** 26.06.2023 **Опубликована онлайн:** 27.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.022

A RARE CASE OF COMBINATION TRICHORINOPHALANGEAL SYNDROME AND MAYER–ROKITANSKY–KÜSTER–HAUSER SYNDROME

Batyrova ZK [✉], Bolshakova AS, Kумыkova ZKh, Kruglyak DA, Uvarova EV, Chuprynin VD, Mamedova FSh, Sadelov IO, Trofimov DY

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

Two forms of Mayer–Rokitansky–Kuster–Hauser (MRKH) syndrome are recognized: isolated uterovaginal agenesis and associated with extragenital malformations, including several well-recognized syndromes. Trichorhinophalangeal syndrome (TRPS) is a rare autosomal dominant condition characterized by facial dysmorphism, ectodermal and skeletal features. TRPS comprises TRPSI (caused by a heterozygous pathogenic variant in TRPS1), TRPSII (caused by contiguous gene deletion of TRPS1, RAD21, and EXT1). Genital anomalies occur particularly in TRPSII. We present a case of rare combination TRPSII with MRKH syndrome. Delayed diagnosis resulted to prolonged pain syndrome and repeated surgery. Recognition of genital anomalies in TRPS allows timely referral diagnosis and appropriate care by paediatrician and adolescent gynaecologists.

Keywords: trichorhinophalangeal syndrome, urogenital anomaly, MRKH syndrome

Acknowledgments: SR Grover from Murdoch Children's Research Institute, Royal Children's Hospital for advices in formulating the concept of the manuscript, AV Asaturova head of the 1st pathoanatomical department of the Kulakov Federal State Budgetary Institution NMICAGP for help in editing the manuscript.

Author contribution: Batyrova ZK, Bolshakova AS — concept; Batyrova ZK, Kruglyak DA, Uvarova EV, Chuprynin VD, Mamedova FSh — collection and processing of material; Batyrova ZK, Bolshakova AS, Kумыkova ZKh — text writing; Kумыkova ZKh, Sadelov IO, Trofimov DY — editing. All authors approved the final manuscript. All authors were involved in the clinical management of the patient and contributed to the final diagnosis.

✉ **Correspondence should be addressed:** Zalina K. Batyrova
Tolbuhina, 3/2, k. 59, Moscow, 121596, Russia; linadoctor@mail.ru

Received: 17.06.2023 **Accepted:** 26.06.2023 **Published online:** 27.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.022

Синдром Майера–Рокитанского–Кюстера–Хаузера (MRKH) (OMIM 277000) встречается у 1 : 5000 живорожденных и характеризуется врожденным отсутствием или гипоплазией матки и верхних двух третей влагалища у женщин с кариотипом 46, XX [1–3]. Синдром может быть изолированным (тип 1) или сочетаться с различными аномалиями (тип 2), при этом относительно часто возникает ассоциация аномалий половой, мочевой и костных систем (MURCS) [2].

Были описаны отдельные случаи МРКХ с транспозицией внутренних органов, аномалией Денди–Уокера, синдромом Меккеля–Грубера, синдромом Барде–Бидля, синдромом Корнелии де Ланге, синдромом Холт–Орама или

синдромом Маккьюсика–Кауфмана [1, 2]. Генетические причины МРКХ в большинстве случаев не известны.

Трихоринофалангеальный синдром типа II (TRPS II) был впервые описан А. Гидеоном в 1966 г., более подробную характеристику в 1969 г. дал Л. О. Лангер [3, 4]. Частота встречаемости среди населения составляет менее 1 : 1 000 000 случаев. В основном характерны тяжелые черепно-лицевые и скелетные аномалии. Пациенты с TRPS обычно имеют специфическое строение черепа с редкими и медленно растущими волосами, выступающими ушными раковинами, редкими бровями, выпуклым грушевидным носом, тонкими губами, удлинённым подбородком и костными аномалиями, включая брахидактилию легкой

или тяжелой степени, дисплазию тазобедренных суставов и невысокий рост [3–8]. Кроме того, у девочек могут быть аномалии развития половых органов [3, 4, 8].

TRPSII, или синдром Лангера–Гидеона (OMIM 150230), обусловлен делецией региона 8q23.3-8q24.11 длинного плеча хромосомы 8, с вовлечением генов TRPS1-EXT1 [2–7], чаще всего диагностируют при помощи хромосомного микроматричного анализа. Ключевыми генами для развития синдрома являются TRPS1, RAD21, EXT1. Мутации в них ассоциируются с аутосомно-доминантным трихоринофалангеальным синдромом типа 1 (OMIM: 190350), синдромом Корнелии де Ланге типа 4 (OMIM: 614701) и синдромом множественных экзостозов I типа (OMIM: 133700) соответственно. Сочетание характерного для этих синдромов фенотипа и объясняет клиническую картину синдрома Лангера–Гидеона.

Хромосомный микроматричный анализ (ХМА) разработан с целью выявления микроскопических и субмикроскопических вариаций числа копий генов (CNV) в геноме [9, 10]. В современных методических рекомендациях и публикациях ХМА рекомендуется в том числе для проведения у детей с расстройствами аутистического спектра, задержкой развития, интеллектуальными нарушениями и/или множественными врожденными аномалиями развития [11–15]. CNV обуславливают до 20% пороков развития половых органов [16]. Интересно, что Ник-Зайнал сообщила о 14% распространенности CNVs в когорте пациенток с изолированной и синдромальной аплазией мюллеровых протоков [15].

На сегодняшний момент имеются только единичные публикации о связи TRPS и пороков половых органов, что затрудняет своевременную диагностику [8].

Описание клинического случая

14-летняя девочка с заподозренным TRPSII обратилась в Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им В. И. Кулакова по поводу первичной аменореи и прогрессирующей циклической боли внизу живота.

Родители девочки не состояли в родстве, в семье есть еще один здоровый ребенок. Согласно анамнезу, собранному со слов родителей, девочка была рождена самопроизвольно от первой самостоятельной, неосложненной беременности, с весом при рождении

3600 г, длиной тела 52 см. В возрасте 2 дней жизни ребенок был переведен в отделение интенсивной терапии в связи с отсутствием сосательных и глотательных рефлексов. Впоследствии были отмечены задержка физического и умственного развития, диспластичное телосложение, специфические черты лица, укорочение кистей и стоп. В возрасте 3 лет был установлен TRPSII, но медицинская документация с данными генетического обследования была утеряна. С четырехлетнего возраста у девочки стали появляться опухолевидные образования в проксимальных отделах обеих плечевых костей, дистальных отделах предплечья, бедренной кости и суставных концах обеих большеберцовых костей. В связи с множественными экзостозами, приводящими к выраженной деформации конечностей, девочка перенесла 27 хирургических вмешательств (рис. 1).

В декабре 2018 г. по причине появления острой боли в нижних отделах живота девочка была госпитализирована по месту жительства. В ходе диагностической лапароскопии обнаружена киста левого яичника, проведено удаление кисты и аппендэктомия. Указаний на аномальное строение внутренних половых органов не было. После выписки из стационара девочку продолжали беспокоить периодические боли в нижних отделах живота с ежемесячным нарастанием их интенсивности. В связи с отсутствием эффекта от проводимой консервативной терапии (нестероидные противовоспалительные препараты, гестагены) родители самостоятельно обратились за помощью в Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им В. И. Кулакова к специалистам отделения детской и подростковой гинекологии.

Состояние девочки при поступлении в стационар было удовлетворительным, рост составлял 144 см, вес 40 кг. Половое развитие по Таннеру соответствовало 3 стадии. Обращали на себя внимание диспластичное телосложение, множественные деформации верхних и нижних конечностей, длинный грушевидный нос, гиперплазия нижней челюсти, крупные выступающие ушные раковины и множественные хрящевые экзостозы (рис. 2).

При гинекологическом исследовании наружные половые органы были развиты правильно, за бахромчатой девственной плевой имелась слепо оканчивающаяся влагалищная ямка глубиной до 1,0 см. При

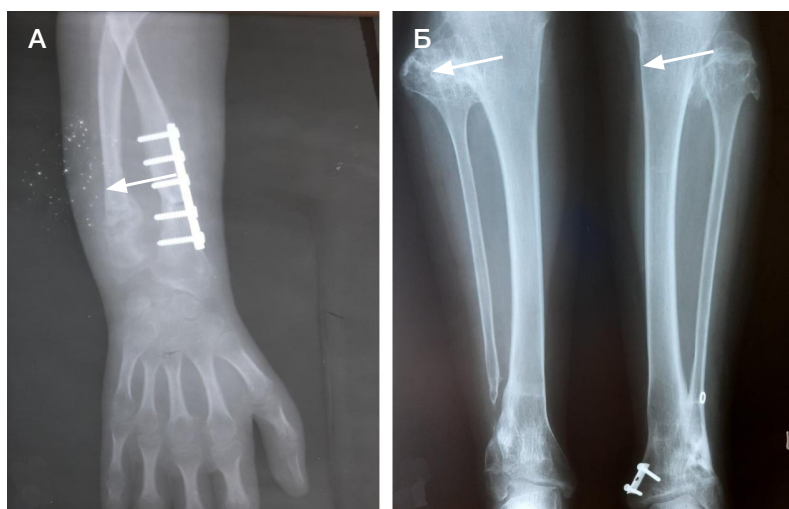


Рис. 1. Рентгенограмма костей верхней (А) и нижней (Б) конечностей с множественными экзостозами (показано стрелками) и металлическими конструкциями после операции

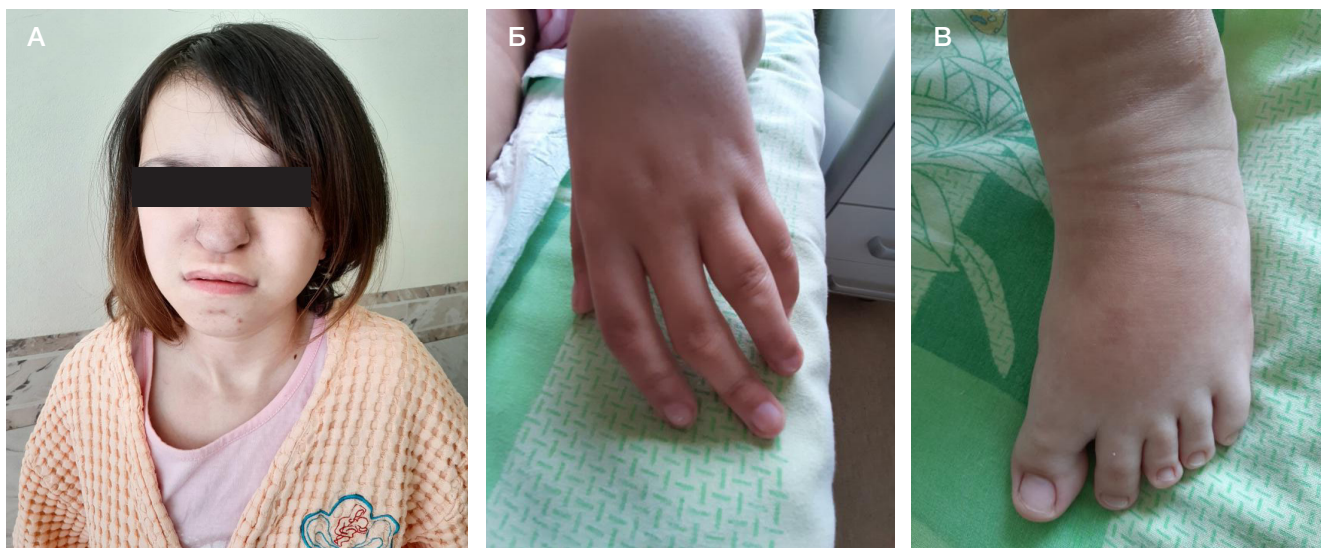


Рис. 2. Типичные дисморфические особенности пациентки: медленно растущие волосы, длинный грушевидный нос с выпуклым кончиком (А), укорочение кистей с увеличением межфаланговых суставов (Б) и стоп (В)

ректоабдоминальном исследовании матка определялась в виде вытянутого болезненного образования. Выполненные лабораторные исследования, включая гормональный статус пациентки, были в пределах нормативных значений.

После генетического консультирования проведено молекулярное кариотипирование на ДНК-микроматрицах. Выявлена патогенная микроделеция размером более 6,9 м.п.н. на длинном плече хромосомы 8: 8q23.3-8q24.12 (115,524,782-122,445,687 п.н.) с вовлечением генов *TRPS1*, *EXT1*, *RAD21* и микродупликация на длинном плече хромосомы 18 (18q12.3) более 2,8 м.п.н. неясной клинической значимости. Молекулярно-генетическое исследование подтвердило TRPS II.

Исследование обоих родителей показало, что микроделеция у пациентки произошла *de novo*. Отец был носителем микродупликации 18q12.3, поэтому ее вклад в фенотип девочки маловероятен.

К сожалению, проведение МРТ органов малого таза оказалось невозможным по причине наличия множества металлических конструкций у пациентки. Ультразвуковое исследование органов малого таза в нашем Центре позволило выявить вытянутую структуру, соответствующую маточному рудименту, смещенную влево и вверх, размерами 38 × 27 × 29 мм с эндометрием толщиной

3 мм, яичники располагались высоко в полости малого таза, шейка матки и влагалище не дифференцировались (рис. 3).

Учитывая циклический болевой синдром в сочетании с результатами УЗИ, была заподозрена обструктивная аномалия половых органов. При выполнении лапароскопической ревизии органов брюшной полости обнаружены два маточных рудимента, расположенных на боковых стенках таза, соединенных соединительнотканной перетяжкой над мочевым пузырем. Левый рудимент был несколько увеличен в размерах с признаками функционирования, правый был представлен мышечным валиком, соединенным с круглой связкой и маточной трубой. Шейка матки и влагалище отсутствовали (рис. 4).

Несмотря на свои размеры, левый маточный рудимент представлял собой структуру, лишенную шейки матки. В подобном случае создание маточно-вагинального анастомоза нецелесообразно, учитывая высокий риск осложнений, а такжеотягощенный анамнез пациентки. По результатам мультидисциплинарного консилиума, включавшего членов этического комитета, с согласия родителей, было принято решение об удалении маточных рудиментов. Послеоперационный период протекал гладко, пациентка была выписана домой в удовлетворительном

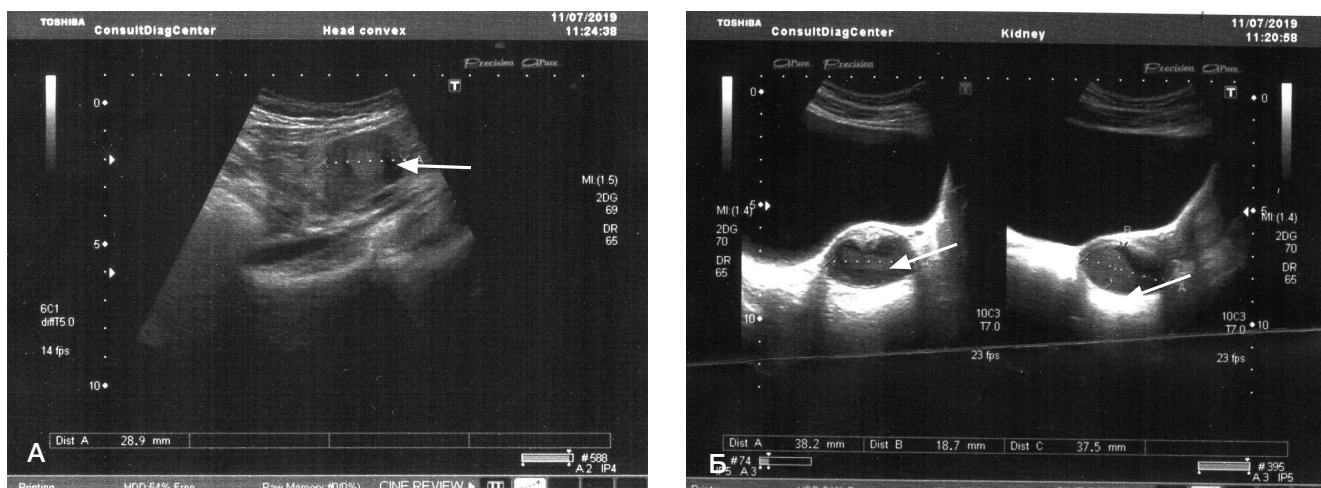


Рис. 3. Трансабдоминальное ультразвуковое исследование: маточный рудимент (поперечное сканирование) (А); та же структура при продольном сканировании (Б)

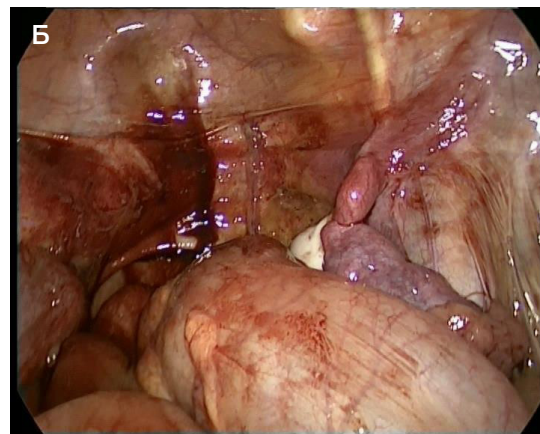
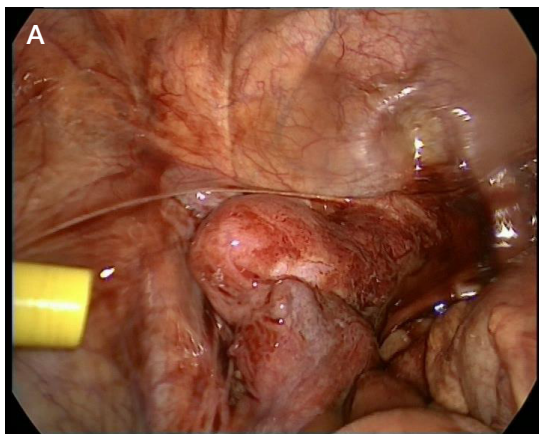


Рис. 4. Лапароскопический вид внутренних половых органов: левый маточный рудимент с признаками функционирования (А); правый маточный рудимент в виде мышечного валика (Б)

состоянии. При последующих визитах (через 1 и 3 месяца после операции) родители указывали на отсутствие болевого синдрома у девочки.

Обсуждение клинического случая

Синдром Лангера–Гидеона включает в себя клинические признаки TRPSI, вызванного гаплоидным дефицитом гена *TRPS1* и множественными экзостозами вследствие делеции гена *EXT1* [16–18]. У некоторых пациентов отмечается пересечение с клиническими признаками синдрома Корнелии де Ланге, тип 4 (OMIM 614701) [19, 20]. В дополнение к клиническим особенностям TRPSII у нашего пробанда была выявлена аглазия матки и влагалища. Синдромальная аглазия матки и влагалища по литературным данным может быть связана с микроделецией региона 17q12 [21], микродупликацией региона 1q21.1 и микроделецией региона Xq21.31 [22]. Также в литературе описано несколько случаев аглазии матки и влагалища у пациентов с делецией региона 16p11.2 [23]. Имеются единичные описания ассоциации TRPS с пороками половых органов [24].

В предыдущих исследованиях сообщалось и о других аномалиях гениталий у пациенток с TRPS II. К примеру, описано наблюдение женщины с атрезией влагалища, гематометрой и делецией региона 8q24.11–q24.12 [19]. Другое наблюдение описывало девочку с клоакальной

аномалией и делецией региона 8q24.11–q24.13 [20]. Сообщалось о гидрометрокольпозе у трех детей с делецией региона 8q24.11–q24.13 [21]. Описана 19-летняя женщина с атрезией гимена, стенозом влагалища с формированием гематометры и делецией 8q23.3–q24.12 [25].

В нашем клиническом наблюдении выявлена делеция региона 8q23.3q24.12 более 6,9 Мб, включающая гены *TRPS1*, *EIF3H*, *RAD21*, *SLC30A8*, *MED30*, *EXT1*, *TNFRSF11B*, *COLEC10*, *MAL2*, *NOV*, *ENPP2*, *TAF2*, *DSCC1*, *DEPTOR*, *COL14A1*, *MRPL13*, *MTBP* и *SNTB1*. Интересно, что патогенные варианты в гене *RAD21* ассоциированы с синдромом Корнелии де Ланге, тип 4, который характеризуется аномалиями развития, в том числе мочеполовой системы, задержкой интеллекта, специфическими чертами лица [26–28]. Таким образом, по нашему мнению, *RAD21* может быть рассмотрен в качестве перспективного гена-кандидата для МРКХ, что требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пациентки с TRPS II требуют мультидисциплинарного подхода с привлечением врача-генетика, педиатра, детского и подросткового гинеколога с целью своевременного обнаружения аномалий половых органов и оказания квалифицированной медицинской помощи.

Литература

- Ledig S, Wieacker. Clinical and Genetic Aspects of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. *Med Genet.* 2018; 30: 3–11. DOI: 10.1007/s11825-018-0173-7. Epub 2018 Feb 21.
- Williams LS, Demir Eksi D, Shen Y, Lossie AC, Chorch LP, Sullivan ME, et al. Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families. *Fertil Steril.* 2017; 108 (1): 145–51. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.017. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28600106; PMCID: PMC5770980.
- For Backhouse B, Hanna, Robevska G, et al. Identification of Candidate Genes for Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome Using Genomic Approaches. *Sex Dev.* 2019; 13: 26–34. DOI: 10.1159/000494896. Epub 2018 Dec 1. DOI: 10.1159/000494896.
- Lüdecke HJ, Johnson C, Wagner MJ, Wells DE, Turleau C, Tommerup N, et al. Molecular definition of the shortest region of deletion overlap in the Langer-Giedion syndrome. *Am J Hum Genet.* 1991; 49: 1197–206.
- Giedon A. Das tricho-rhino-phalangeale syndrome. *Helv Paediatr Acta.* 1966; 21: 475–85.
- Maas S, Shaw A, Bikker H, et al. Trichorhinophalangeal Syndrome. 2017 Apr 20. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020.
- Trippella G, Lionetti P, Naldini S, et al. An early diagnosis of trichorhinophalangeal syndrome type 1: a case report and a review of literature. *Ital J Pediatr.* 2018; 44: 138. DOI: 10.1186/s13052-018-0580-z.
- Su W, Shi X, Lin M, et al. Non-ossifying fibroma with a pathologic fracture in a 12-year-old girl with tricho-rhino-phalangeal syndrome: a case report. *BMC Med Genet.* 2018; 19: 211. DOI: 10.1186/s12881-018-0732-4.
- Faucett WA, Savage MS. Chromosomal microarray testing. *JAAPA.* 2012; 25 (1): 65–6. DOI: 10.1097/O1720610-201201000-00016. PMID: 22384761.
- United Healthcare Medical Policy. Chromosome microarray testing. 10/1/2015. Available from: <https://www.unitedhealthcareonline.com>.

- com/ccmcontent/Provider/UHC/en-US/Assets/ProviderStaticFiles/ProviderStaticFilesPdf/ToolsandResources/PoliciesandProtocols/MedicalPolicies/MedicalPolicies/Chromosome_Microarray_Testing.pdf. Accessed June 26, 2016.
11. Riggs ER, Wain KE, Riethmaier D, Smith-Packard B, Faucett WA, Hoppman N, et al. Chromosomal microarray impacts clinical management. *Clin Genet.* 2014; 85 (2): 147–53. DOI: 10.1111/cge.12107. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23347240.
 12. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86: 749–64. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006. PMID: 20466091. PMCID: PMC2869000.
 13. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision. 2013. DOI: 10.1038/gim.2013.129. PMID: 24071793.
 14. Josifova DJ. Genetics of gynaecological disorders. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017; 42: 100–13. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.05.001. Epub 2017 May 10. PMID: 28684328.
 15. Nik-Zainal S, Strick R, Storer M, Huang N, Rad R, Willatt L, et al. High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Müllerian aplasia. *Med Genet.* 2011; 48 (3): 197–204.
 16. Cappuccio G, Genesisio R, Ronga V, Casertano A, Izzo A, Riccio MP, et al. Complex chromosomal rearrangements causing Langer-Giedion syndrome atypical phenotype: genotype-phenotype correlation and literature review. *Am J Med Genet A.* 2014; 164A (3): 753–9. DOI: 10.1002/ajmg.a.36326. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24357330.
 17. Plaza-Benhumea L, Valdes-Miranda JM, Toral-López J, et al. Trichorhinophalangeal syndrome type II due to a novel 8q23.3-q24.12 deletion associated with imperforate hymen and vaginal stenosis. *Br J Dermatol.* 2014; 171: 1581–3. DOI: 10.1111/bjd.13177. Epub 2014 Oct 30.
 18. Selenti N, Tzetis M, Braoudaki M, Gianikou K, Kitsiou-Tzeli S, Fryssira H. An interstitial deletion at 8q23.1-q24.12 associated with Langer-Giedion syndrome / Trichorhinophalangeal syndrome (TRPS) type II and Cornelia de Lange syndrome 4. DOI: 10.1186/s13039-015-0169-9. PMID: 26269715. PMCID: PMC4534011.
 19. Partington MW, Rae J, Payne MJ. Haematometra in the Langer-Giedion syndrome. *J Med Genet.* 1991; 28: 644–5. DOI: 10.1136/jmg.28.9.644-b.
 20. Ramos FJ, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. Tricho-rhinophalangeal syndrome type II (Langer-Giedion) with persistent cloaca and prune belly sequence in a girl with 8q interstitial deletion. *Am J Med Genet.* 1992; 44: 790–4. DOI: 10.1002/ajmg.1320440614. PMID: 1481848.
 21. Bernardini L, Gimelli S, Gervasini C, Carella M, Baban A, Frontino G, et al. Recurrent microdeletion at 17q12 as a cause of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: two case reports. *Orphanet J Rare Dis.* 2009; 4: 25. PubMed: 19889212.
 22. Cherokei C, Krepischi-Santos AC, Szuhai K, Brenner V, Kim CA, Otto PA, Rosenberg C. Genomic imbalances associated with müllerian aplasia. *J Med Genet.* 2008; 45: 228–32. PubMed: 18039948.
 23. Nik-Zainal S, Strick R, Storer M, et al: High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Müllerian aplasia. *J Med Genet* 2011; 3: 197–204.
 24. Gericke GS, Fialkov J: The Langer-Giedion phenotype associated with a unique skeletal finding in a mentally retarded adolescent male. *S Afr Med J.* 1980; 57: 548.
 25. Fryns JP. Trichorhinophalangeal syndrome type 2: another syndromic form of hydrometrocolpos. *Am J Med Genet.* 1997; 73: 233. DOI: 10.1002/(sici)1096--8628(1997)73:2<233::aid-ajmg23>3.0.co;2-u. PMID: 9409879.
 26. Plaza-Benhumea L, Valdes-Miranda JM, Toral-López J, Pérez-Cabrera A, Cuevas-Covarrubias S. Trichorhinophalangeal syndrome type II due to a novel 8q23.3-q24.12 deletion associated with imperforate hymen and vaginal stenosis. DOI: 10.1111/bjd.13177. PMID: 24909397.
 27. Plaza-Benhumea L, Valdes-Miranda JM, Toral-López J, et al. Trichorhinophalangeal syndrome type II due to a novel 8q23.3-q24.12 deletion associated with imperforate hymen and vaginal stenosis. *Br J Dermatol.* 2014; 171: 1581–3. DOI: 10.1111/bjd.13177. Epub 2014 Oct 30.
 28. Boyle MI, Jespersgaard C, Brøndum-Nielsen K, Bisgaard AM, Tümer Z. Cornelia de Lange syndrome. *Clin Genet.* 2015; 88 (1): 1–12. DOI: 10.1111/cge.12499. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25209348.

References

1. Ledig S, Wieacker. Clinical and Genetic Aspects of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. *Med Genet.* 2018; 30: 3–11. DOI: 10.1007/s11825-018-0173-7. Epub 2018 Feb 21.
2. Williams LS, Demir Eksi D, Shen Y, Lössie AC, Chorich LP, Sullivan ME, et al. Genetic analysis of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome in a large cohort of families. *Fertil Steril.* 2017; 108 (1): 145–51. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.017. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28600106; PMCID: PMC5770980.
3. For Backhouse B, Hanna, Robevska G, et al. Identification of Candidate Genes for Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome Using Genomic Approaches. *Sex Dev.* 2019; 13: 26–34. DOI: 10.1159/000494896. Epub 2018 Dec 1. DOI: 10.1159/000494896.
4. Lüdecke HJ, Johnson C, Wagner MJ, Wells DE, Turleau C, Tommerup N, et al. Molecular definition of the shortest region of deletion overlap in the Langer-Giedion syndrome. *Am J Hum Genet.* 1991; 49: 1197–206.
5. Giedon A. Das tricho-rhino-phalangeale syndrome. *Helv Paediatr Acta.* 1966; 21: 475–85.
6. Maas S, Shaw A, Bikker H, et al. Trichorhinophalangeal Syndrome. 2017 Apr 20. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020.
7. Trippella G, Lionetti P, Naldini S, et al. An early diagnosis of trichorhinophalangeal syndrome type 1: a case report and a review of literature. *Ital J Pediatr.* 2018; 44: 138. DOI: 10.1186/s13052-018-0580-z.
8. Su W, Shi X, Lin M, et al. Non-ossifying fibroma with a pathologic fracture in a 12-year-old girl with tricho-rhino-phalangeal syndrome: a case report. *BMC Med Genet.* 2018; 19: 211. DOI: 10.1186/s12881-018-0732-4.
9. Faucett WA, Savage MS. Chromosomal microarray testing. *JAAPA.* 2012; 25 (1): 65–6. DOI: 10.1097/01720610-201201000-00016. PMID: 22384761.
10. United Healthcare Medical Policy. Chromosome microarray testing. 10/1/2015. Available from: https://www.unitedhealthcareonline.com/ccmcontent/Provider/UHC/en-US/Assets/ProviderStaticFiles/ProviderStaticFilesPdf/ToolsandResources/PoliciesandProtocols/MedicalPolicies/MedicalPolicies/Chromosome_Microarray_Testing.pdf. Accessed June 26, 2016.
11. Riggs ER, Wain KE, Riethmaier D, Smith-Packard B, Faucett WA, Hoppman N, et al. Chromosomal microarray impacts clinical management. *Clin Genet.* 2014; 85 (2): 147–53. DOI: 10.1111/cge.12107. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23347240.
12. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010; 86: 749–64. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.006. PMID: 20466091. PMCID: PMC2869000.
13. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision. 2013. DOI: 10.1038/gim.2013.129. PMID: 24071793.
14. Josifova DJ. Genetics of gynaecological disorders. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017; 42: 100–13. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.05.001. Epub 2017 May 10. PMID: 28684328.

15. Nik-Zainal S, Strick R, Storer M, Huang N, Rad R, Willatt L, et al. High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Müllerian aplasia. *Med Genet.* 2011; 48 (3): 197–204.
16. Cappuccio G, Genesio R, Ronga V, Casertano A, Izzo A, Riccio MP, et al. Complex chromosomal rearrangements causing Langer-Giedion syndrome atypical phenotype: genotype-phenotype correlation and literature review. *Am J Med Genet A.* 2014; 164A (3): 753–9. DOI: 10.1002/ajmg.a.36326. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24357330.
17. Plaza-Benhumea L, Valdes-Miranda JM, Toral-López J, et al. Trichorhinophalangeal syndrome type II due to a novel 8q23.3-q24.12 deletion associated with imperforate hymen and vaginal stenosis. *Br J Dermatol.* 2014; 171: 1581–3. DOI: 10.1111/bjd.13177. Epub 2014 Oct 30.
18. Selenti N, Tzetis M, Braoudaki M, Gianikou K, Kitsiou-Tzeli S, Fryssira H. An interstitial deletion at 8q23.1-q24.12 associated with Langer-Giedion syndrome / Trichorhinophalangeal syndrome (TRPS) type II and Cornelia de Lange syndrome 4. DOI: 10.1186/s13039-015-0169-9. PMID: 26269715. PMCID: PMC4534011.
19. Partington MW, Rae J, Payne MJ. Haematometra in the Langer-Giedion syndrome. *J Med Genet.* 1991; 28: 644–5. DOI: 10.1136/jmg.28.9.644-b.
20. Ramos FJ, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Zackai EH. Tricho-rhinophalangeal syndrome type II (Langer-Giedion) with persistent cloaca and prune belly sequence in a girl with 8q interstitial deletion. *Am J Med Genet.* 1992; 44: 790–4. DOI: 10.1002/ajmg.1320440614. PMID: 1481848.
21. Bernardini L, Gimelli S, Gervasini C, Carella M, Baban A, Frontino G, et al. Recurrent microdeletion at 17q12 as a cause of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: two case reports. *Orphanet J Rare Dis.* 2009; 4: 25. PubMed: 19889212.
22. Cheroki C, Krepischi-Santos AC, Szuhai K, Brenner V, Kim CA, Otto PA, Rosenberg C. Genomic imbalances associated with mullerian aplasia. *J Med Genet.* 2008; 45: 228–32. PubMed: 18039948.
23. Nik-Zainal S, Strick R, Storer M, et al: High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Mullerian aplasia. *J Med Genet* 2011; 3: 197–204.
24. Gericke GS, Fialkov J: The Langer-Giedion phenotype associated with a unique skeletal finding in a mentally retarded adolescent male. *S Afr Med J.* 1980; 57: 548.
25. Fryns JP. Trichorhinophalangeal syndrome type 2: another syndromic form of hydrometrocolpos. *Am J Med Genet.* 1997; 73: 233. DOI: 10.1002/(sici)1096--8628(1997)73:2<233::aid-ajmg23>3.0.co;2-u. PMID: 9409879.
26. Plaza-Benhumea L, Valdes-Miranda JM, Toral-López J, Pérez-Cabrera A, Cuevas-Covarrubias S. Trichorhinophalangeal syndrome type II due to a novel 8q23.3-q24.12 deletion associated with imperforate hymen and vaginal stenosis. DOI: 10.1111/bjd.13177. PMID: 24909397.
27. Plaza-Benhumea L, Valdes-Miranda JM, Toral-López J, et al. Trichorhinophalangeal syndrome type II due to a novel 8q23.3-q24.12 deletion associated with imperforate hymen and vaginal stenosis. *Br J Dermatol.* 2014; 171: 1581–3. DOI: 10.1111/bjd.13177. Epub 2014 Oct 30.
28. Boyle MI, Jespersgaard C, Brøndum-Nielsen K, Bisgaard AM, Tümer Z. Cornelia de Lange syndrome. *Clin Genet.* 2015; 88 (1): 1–12. DOI: 10.1111/cge.12499. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25209348.

ДЕТЕКЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ПОТЕРИ ГЕНА *SMN1* С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПЦР-РВ

В. Д. Назаров¹, К. К. Чербило¹✉, С. В. Лапин¹, Д. В. Сидоренко¹, Е. А. Девяткина¹, А. К. Мусонова¹, Т. В. Петрова², А. И. Никифорова², А. В. Иванова²

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² ООО «ДНК-Технология», Москва, Россия

Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (5q-CMA) — аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, характеризующееся потерей двигательных нейронов в передних рогах спинного мозга. С 2023 г. CMA включена в обязательный неонатальный скрининг на территории Российской Федерации. Неонатальный скрининговый тест на 5q-CMA должен выявлять все типы гомозиготной потери гена *SMN1*. Целью исследования была сравнительная оценка возможности определения гомозиготной потери экзона 7 гена *SMN1* с помощью теста на основе ПЦР-РВ с методом MLPA у пациентов с 5q-CMA, а также с различными изменениями числа копий гена *SMN1*. С помощью набора было проанализировано 206 образцов ДНК (группа 1), выделенных и очищенных из цельной крови, и 135 образцов ДНК (группа 2), выделенных и очищенных из сухих пятен крови, с известным количеством копий генов *SMN1* и *SMN2*. Количество копий генов *SMN1* и *SMN2* определяли методом MLPA, который был выбран в качестве референсного метода. Показано, что набор обнаруживает гомозиготную потерю гена *SMN1* во всех образцах, у которых подтверждена гомозиготная потеря гена *SMN1* с помощью MLPA (группа 1: $n = 67$; 33%; группа 2: $n = 19$; 14%). В то же время во всех образцах с 1–3 копиями гена *SMN1* результаты набора были отрицательными (группа 1: $n = 139$; 67%; группа 2: $n = 116$; 86%). Набор демонстрирует высокую эффективность и позволяет обнаруживать все возможные молекулярные формы гомозиготной потери гена *SMN1* как в образцах ДНК, выделенных из цельной крови, так и из сухих пятен крови.

Ключевые слова: спинальная мышечная атрофия, ген *SMN1*, неонатальный скрининг, ПЦР-РВ

Финансирование: все наборы ПЦР-детекции в режиме реального времени были предоставлены компанией ООО «ДНК-технология».

Вклад авторов: В. Д. Назаров, С. В. Лапин — концепция; Д. В. Сидоренко, Е. А. Девяткина, А. К. Мусонова — исследование; Т. В. Петрова, А. И. Никифорова, А. В. Иванова — методология; В. Д. Назаров, К. К. Чербило — написание и подготовка оригинального проекта; К. К. Чербило, С. В. Лапин, Т. В. Петрова, А. И. Никифорова, А. В. Иванова — написание, рецензирование и редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова (протокол № 274 от 26 июня 2023 г.); проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации 1975 г. Письменное информированное согласие было получено от всех участников или их родителей.

✉ **Для корреспонденции:** Карина Константиновна Чербило
ул. Льва Толстого, 6-8, г. Санкт-Петербург, 197022, Россия; k.cherebillo@mail.ru

Статья получена: 30.05.2023 **Статья принята к печати:** 22.06.2023 **Опубликована онлайн:** 30.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.025

DETECTION OF *SMN1* LOSS WITH PCR-BASED SCREENING TEST

Nazarov VD¹, Cherebillo CC¹✉, Lapin SV, Sidorenko DV¹, Devyatkina YA¹, Musonova AC¹, Petrova TV², Nikiforova AI², Ivanova AV²

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, St. Petersburg, Russia

² DNA-Technology LLC, Moscow, Russia

Spinal muscular atrophy (SMA) is an inherited neuromuscular disease characterized by progressive skeletal muscular weakness and atrophy. The newborn screening for spinal muscular atrophy should define all molecular forms of SMA. The aim of this study is to compare a PCR-based test for detection of homozygous *SMN1* loss with multiple ligation probe amplification (MLPA) in patients with spinal muscular atrophy and other numerical changes of the *SMN1* gene. PCR-based test was used to detect exon 7 of *SMN1* gene homozygous loss. The study included 341 samples of patients with clinical suspicion of SMA from Biobank of Centre of Molecular Medicine of Pavlov State Medical University (Saint-Petersburg, Russia). Group 1 included 206 whole blood samples and Group 2 included 135 dried blood spot (DBS) samples. Copy number of the *SMN1* and *SMN2* genes had been evaluated with MLPA as a reference method. The results showed that kit was able to detect homozygous *SMN1* loss in all samples from group 1 and 2 (Group 1: $n = 67$; 33%; Group 2: $n = 19$; 14%). At the same time in all samples with 1–3 copies of the *SMN1* gene, the results of the kit were negative for homozygous loss of *SMN1* gene (Group 1: $n = 139$; 67%; Group 2: $n = 116$; 86%). Kit showed high effectiveness in the detection of homozygous loss *SMN1* gene. The kit detects all possible molecular forms of homozygous *SMN1* gene loss in both DNA samples extracted from the whole blood and DBS.

Keywords: Spinal muscular atrophy, *SMN1* gene, newborn screening, real-time PCR

Funding: All tests was provided by DNA-Technology LLC.

Author contribution: Nazarov VD, Lapin SV — concept; Sidorenko DV, Devyatkina YA, Musonova AC — investigation; Petrova TV, Nikiforova AI, Ivanova AV — methodology; Nazarov VD, Cherebillo CC — wrining, original draft preparation; Cherebillo CC, Lapin SV, Petrova TV, Nikiforova AI, Ivanova AV — writing, review & editing.

Compliance with ethical standards: this study was approved by the local Ethics Committee of the Pavlov First Saint Petersburg State Medical University (№ 274 from 26.06.2023). Written informed consent was obtained from all participants or their parents. The 1975 Declaration of Helsinki was rigorously adhered to secure the rights of the patients.

✉ **Correspondence should be addressed:** Carina C. Cherebillo
6/8, Lva Tolstogo, Saint-Petersburg, 197022, Russia; k.cherebillo@mail.ru

Received: 30.05.2023 **Accepted:** 22.06.2023 **Published online:** 30.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.025

Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q (5q-CMA) — одно из самых распространенных аутосомно-рецессивных нервно-мышечных заболеваний у детей, которое характеризуется утратой двигательных нейронов в передних рогах спинного мозга, что приводит к прогрессирующему поражению проксимальных отделов скелетной мускулатуры. Этиология заболевания связана с абберациями гена выживаемости мотонейронов *SMN1* (от англ. *survival motor neuron 1 gene*), локализованного в 5q13-регионе 5-й хромосомы. Встречаемость заболевания составляет один случай на 6000–10 000 новорожденных [1]. Быстрая и необратимая потеря двигательных нейронов при тяжелых формах 5q-CMA начинается в течение первых 3 месяцев жизни [2]. Отложенная молекулярно-генетическая диагностика 5q-CMA приводит к несвоевременному лечению и повышенному риску тяжелой инвалидизации пациента.

В 95% случаев 5q-CMA возникает в результате гомозиготной потери гена *SMN1* и последующего снижения синтеза белка выживаемости мотонейронов. Оставшиеся случаи заболевания приходится на компаунд-гетерозиготы, когда потеря гена *SMN1* на одном аллеле сочетается с точечными мутациями гена *SMN1* другого аллеля [3]. К настоящему времени спинальная мышечная атрофия у компаунд-гетерозигот не диагностируется ни в одной неонатальной программе мира [4]. Распространенность носительства гетерозиготной потери гена *SMN1* в российской популяции составляет 1 : 36 [5]. Помимо вышеперечисленных аббераций, часто в общей популяции встречается дупликация гена *SMN1*, однако данный генотип не приводит к 5q-CMA [1]. Высокая частота встречаемости изменения копиности *SMN1* обусловлена генетической нестабильностью данного региона вследствие наличия инвертированной последовательности функциональных генов *SMN1*, *SERF1A*, *NAIP*, *GTF2H2A* и соответствующих им центромерных копий *SMN2*, *SERF1B*, *NAIPΔ5*, *GTF2H2B* [1]. Гомолог гена *SMN1*, ген *SMN2*, тоже состоит из девяти экзонов и кодирует белок выживаемости мотонейронов. Гены различаются между собой по пяти нуклеотидам в диапазоне с 6-го интрона до 8-го экзона. Однако ключевая замена цитозина на тимин в 7-м экзоне гена *SMN2* (с.840C > T) приводит к разрыву сайта связывания с экзонным энхансером сплайсинга и образованию сайта связывания с экзонным сайленсером. В результате вышеуказанных изменений происходит исключение 7-го экзона у 90% транскриптов *SMN2*, а синтезированный белок *SMNΔ7* становится функционально неполноценным и нестабильным, что и обуславливает его быструю деградацию убиквитин-протеасомной системой [1]. Стоит отметить, что основным источником белка выживаемости мотонейронов является ген *SMN1*, а ген *SMN2* служит модификатором течения заболевания 5q-CMA вследствие сохранения 10% неизмененных транскриптов *SMN2* и увеличения числа копий гена *SMN2* [6]. Различают несколько клинических форм 5q-CMA. CMA типа 0 характеризуют отсутствие гена *SMN1* и наличие одной копии гена *SMN2*. Как правило, данная форма приводит к дебюту заболевания во внутриутробном периоде. Болезнь Верднига–Гоффмана (CMA типа I) развивается у пациентов в возрасте до 6 месяцев, имеющих чаще всего 2–3 копии гена *SMN2*, и является наиболее частой разновидностью, на которую приходится приблизительно половина случаев заболевания 5q-CMA [3, 7]. У младенцев с данной формой 5q-CMA отсутствуют симптомы заболевания при рождении, но впоследствии у них наблюдается задержка

развития двигательных функций, и возникают трудности с кормлением в течение первого полугодия жизни. Пациенты со CMA I типа не способны сидеть самостоятельно. При CMA II типа (болезнь Дубовица), которая является менее тяжелой формой заболевания, чаще всего можно наблюдать от 2 до 4 копий гена *SMN2*. Такие дети в возрасте от 6 до 18 месяцев могут самостоятельно сидеть, однако никогда не ходят, но большинство этих пациентов доживают до зрелого возраста. При CMA III типа (болезнь Кугельберга–Веландер) число копий гена *SMN2* чаще всего варьирует от 3 до 5. При данной форме дебют CMA происходит у пациентов в возрасте с 18 месяцев, и такие пациенты способны самостоятельно сидеть и стоять и в какой-то момент жизни достигают возможности самостоятельно ходить. CMA IV типа считают самой легкой и наименее распространенной формой 5q-CMA с дебютом во взрослом возрасте [3, 7].

Как уже было сказано, в патогенезе заболевания основную роль играет утрата гена *SMN1*, однако различают несколько форм его потери в виде истинной делеции, конверсии гена, формировании гибридных (химерных) *SMN1/SMN2*-структур, а также потери только нескольких экзонов гена *SMN1* (частичная делеция). Под классической делецией понимают делецию, включающую 7-й и 8-й экзоны гена *SMN1* без реципрокного увеличения числа копий гена *SMN2*. Частичная делеция характеризуется изолированной потерей 7-го или 8-го экзона на одном из аллелей гена *SMN1* при сохранении числа копий данных экзонов в гене *SMN2* [8]. При конверсии осуществляется реципрокное увеличение количества копий гена *SMN2* [9]. Образование химерных генов *SMN1/SMN2*, в которых имеются участки, принадлежащие как гену *SMN1*, так и псевдогену *SMN2*, и для которых характерно неравное соотношение 7-го и 8-го экзонов, тоже является одним из механизмов потери гена *SMN1* [10]. Следует отметить, что у пациентов с 5q-CMA можно наблюдать как отдельные формы гомозиготной потери гена *SMN1*, так и комбинированные случаи.

С точки зрения молекулярного патогенеза заболевания восстановление уровня белка SMN у пациентов с 5q-CMA является наиболее обоснованным подходом лечения. На экспериментальных моделях было показано, что выключение синтеза белка выживаемости мотонейронов по-разному влияет на их продолжительность жизни: чем раньше происходит выключение, тем хуже выживаемость [11]. Более того, раннее восполнение белка SMN приводит к значительному увеличению выживаемости в исследованиях на экспериментальных мышечных моделях [12]. Упомянутые исследования позволили предположить возможную высокую клиническую эффективность пресимптоматической терапии у новорожденных, у которых обнаружена патологическая абберация в гене *SMN1*. У новорожденных с двумя или тремя копиями гена *SMN2*, у которых начало лечения нусинерсеном во II фазе исследования NURTURE было начато на доклиническом этапе, были продемонстрированы более высокие показатели двигательных функций по сравнению с пациентами, у которых лечение было инициировано на симптоматической стадии 5q-CMA [13]. Другое многоцентровое клиническое исследование III фазы SPR1NT (онасемногеном абепаровеком) было посвящено изучению эффективности и безопасности применения препарата также до появления клинических симптомов у детей с биаллельной потерей гена *SMN1* и тремя копиями гена *SMN2*. Результаты исследования были однозначны:

все участники исследования достигли этапов моторного развития, характерных для здоровых детей, не имеющих патологической аберрации *SMN1* [14]. Имеющаяся терапия и возможность применения пресимптоматического лечения в настоящее время оправдывают проведение скрининга новорожденных на 5q-CMA. Такие страны, как Австралия, Бельгия, Канада, Германия, Италия, Япония, Норвегия, Нидерланды, Польша и Тайвань, а также 46 штатов в США ввели обязательный скрининг новорожденных на 5q-CMA. В Российской Федерации обязательный скрининг на 5q-CMA для всех новорожденных был запущен в 2023 г. [15].

«Золотым стандартом» диагностики 5q-CMA является мультиплексная лигазная цепная реакция (MLPA), однако данный метод неприменим в качестве скринингового в связи с трудоемкостью и высокой стоимостью [16, 17]. Наиболее приемлемы для скрининга различные модификации метода полимеразной цепной реакции с детекцией сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ), выявляющие гомозиготную потерю 7-го экзона гена *SMN1*. Это подтверждено в ряде больших работ и метаанализов [18–20]. В связи с высокой клинической актуальностью ранней диагностики 5q-CMA, а также началом с 2023 г. обязательного неонатального скрининга в РФ на данное заболевание существует потребность в диагностических молекулярно-генетических тестах, которые позволяли бы с высокой точностью выявлять все возможные формы гомозиготной потери гена *SMN1*. Следует также отметить, что одним из наиболее важных требований к неонатальному скрининговому тесту на CMA является возможность выявления гомозиготной потери гена *SMN1* в образцах сухих пятен крови (DBS, от англ. *dried blood spot*).

Российская компания «ДНК-технология» выпустила новый набор, основанный на методе ПЦР-РВ, для молекулярного скрининга на CMA у новорожденных. Однако крайне необходима его расширенная апробация для определения возможности выявления всех форм потери гена *SMN1*, которые ранее определяли с помощью метода MLPA.

Целью работы была сравнительная оценка возможности определения гомозиготной потери экзона 7 гена *SMN1* с помощью теста на основе ПЦР-РВ с методом MLPA у пациентов с 5q-CMA, а также с различными изменениями числа копий гена *SMN1*.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов, методика и выделение ДНК

Образцы ДНК, выделенные из цельной крови (группа 1)

Для оценки возможности детекции различных типов гомозиготной потери гена *SMN1* была собрана когорта, которая состояла из 206 образцов из Биобанка НМЦ Минздрава России по молекулярной медицине Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия). Пациенты с клиническим подозрением на 5q-CMA были направлены в лабораторию ПСПбГМУ им. И. П. Павлова с 2019 по 2021 г. Геномную ДНК выделяли из периферической крови с помощью набора ExtractDNA Blood & Cells (Evrogen; Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию полученной ДНК доводили до конечной концентрации 50 нг/мкл. Количество копий генов *SMN1* и *SMN2* оценивали с помощью набора MLPA (P060,

MRC-Holland; Нидерланды) в соответствии с инструкциями производителя.

Все образцы были разделены на семь подгрупп в соответствии с количеством копий генов *SMN1* и *SMN2*. Подгруппа 1 «Норма» (54 образца): две копии генов *SMN1* и *SMN2* — так называемый «эталонный генотип». Подгруппа 2 «Делеция» (девять образцов): отсутствие гена *SMN1* без увеличения числа копий *SMN2*. Подгруппа 3 «Конверсия» (47 образцов): отсутствие гена *SMN1* при увеличении числа копий *SMN2*. Подгруппа 4 «Гибрид» (девять образцов): гомозиготная делеция экзона 7 и гетерозиготная делеция экзона 8 гена *SMN1* с увеличением числа копий экзона 7 *SMN2*. Подгруппа 5 «Носитель» (51 образец): одна копия гена *SMN1*. Подгруппа 6 «Дупликация» (23 образца): 3 копии гена *SMN1*. Подгруппа 7 «Другое» (13 образцов) содержала различные комбинации количества копий генов *SMN1* и *SMN2*, которые не соответствовали критериям других подгрупп (см. рисунок).

Образцы ДНК, выделенные из DBS (группа 2)

Для подтверждения возможности обнаружения гомозиготной потери гена *SMN1* в ДНК, выделенной из образцов сухих пятен крови, группа из 135 пациентов, кровь которых транспортировалась в высушенном состоянии на мембране, была взята из Биобанка НМЦ Минздрава России по молекулярной медицине Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия). Пациенты с клиническим подозрением на 5q-CMA были направлены в лабораторию ПСПбГМУ им. И. П. Павлова с 2019 по 2021 г. Геномная ДНК была выделена из сухих пятен крови с использованием PREP-CITO DBS (ДНК-Технология; Россия) в соответствии с инструкциями производителя. У всех пациентов количество копий генов *SMN1* и *SMN2* оценивали с помощью метода MLPA (P060, MRC-Holland; Нидерланды) в соответствии с протоколом для сухих пятен крови.

Все образцы были разделены на шесть подгрупп: «Норма», «Делеция», «Конверсия», «Гибрид», «Носитель», «Другое» (табл. 1).

Анализ мультиплексной лигазной цепной реакции (MLPA)

Исследование MLPA проводили с использованием набора P060 (MRC-Holland; Нидерланды) в соответствии с инструкциями производителя для ДНК, выделенной и очищенной из цельной крови (группа 1) и из сухих пятен крови (группа 2). Набор содержит 17 эталонных зондов и четыре специфических зонда, связывающихся с последовательностями в экзонах 7 и 8 генов *SMN1* и *SMN2*. Полученные продукты реакции MLPA анализировали с помощью генетического анализатора ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific; США). Относительную высоту пика каждого образца рассчитывали и сравнивали с нормальным контролем с помощью приложения для анализа MLPA GeneMarker (SoftGenetics; США). Наличие изменения количества копий генов *SMN1/SMN2* оценивали в соответствии с инструкцией к набору MLPA.

НеоСкрин SMA/TREC/KREC

Тест НеоСкрин SMA/TREC/KREC был проведен для всех образцов из групп 1 и 2. Набор НеоСкрин SMA/TREC/KREC

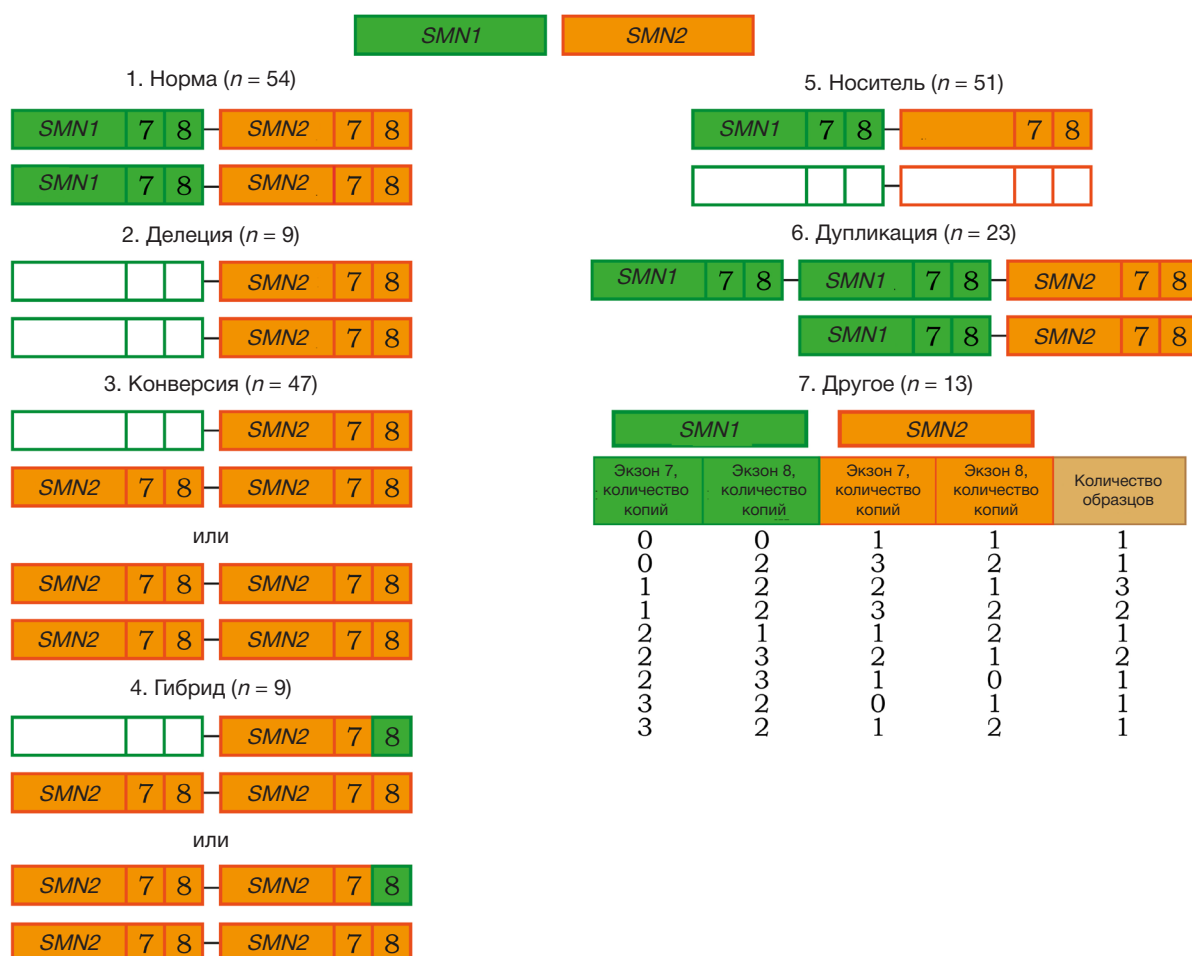


Рис. Типы количественного изменения генов SMN1 и SMN2 в каждой подгруппе

(ДНК-Технология; Россия) предназначен для выявления гомозиготной потери экзона 7 гена SMN1 и оценки уровней Т-рецепторных эксцизионных колец рецепторов (TREC) и каппа-делеционных рекомбинационных эксцизионных колец (KREC) в сухих пятнах крови и цельной крови. Метод основан на амплификации TREC, KREC, экзона 7 гена SMN1 и фрагмента нормализующего гена LTC4S (или эндогенного внутреннего контроля (IC), однокопийного геномного локуса гена лейкотриенсинтазы C4) методом мультиплексной ПЦР. Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет одновременно

регистрировать результаты различных реакций амплификации, протекающих в одной и той же пробирке. В табл. 2 показаны каналы обнаружения продуктов ПЦР-реакции.

Анализ результатов теста НеоСкрин SMA/TREC/KREC проводили с использованием термоциклера для детекции в реальном времени DTprime (ДНК-Технология; Россия) в соответствии с инструкциями производителя (табл. 3). Для оценки эффективности анализа в каждый цикл ПЦР включали положительный контроль (входит в набор для определения ПЦР) и отрицательный контроль.

Таблица 1. Количество копий генов SMN1 и SMN2 по данным анализа MLPA в группе 2

Подгруппа	Результаты MLPA				Количество образцов
	SMN1 ген		SMN2 ген		
	Экзон 7	Экзон 8	Экзон 7	Экзон 8	
Норма	2	2	4	4	10
	2	2	3	3	35
	2	2	2	2	54
Делеция	0	0	2	2	3
Конверсия	0	0	4	4	2
	0	0	3	3	11
Гибрид	0	1	3	2	2
Носитель	1	1	2	2	9
Другое	0	1	2	1	1
	1	2	1	1	4
	1	2	3	2	4

Таблица 2. Каналы обнаружения ПЦР-продуктов

Fam	Hex	Rox	Cy5
TREC	SMN1 (экзон 7 гена SMN1)	KREC	IC (Внутренний контроль)

Таблица 3. Условия проведения ПЦР

Этап	Температура, °C	Минуты	Секунды	Количество циклов	Оптические измерения	Тип этапа
1	80	2	00	1		Цикл
	94	5	00			
2	94	0	30	5	√	Цикл
	64	0	15			
3	94	0	10	45	√	Цикл
	64	0	15			
4	94	0	5	1		Цикл
5	10	Хранение		Хранение

Положительный контроль С+ № 1, содержащий ДНК-плазмиды с указанными мишенями — TREC, KREC, SMN1, IC в равной концентрации, предназначен для оценки эффективности ПЦР. Положительный контроль С+ № 2 с плазмидным эквивалентом экзона 7 гена SMN2 позволяет оценить блокирование амплификации SMN2 (контроль специфичности амплификации SMN1).

Анализ потери экзона 7 гена SMN1 основан на оценке разности циклов (ΔC_p) между C_p SMN1 (канал Hex) и IC (канал Cy5) ($\Delta S_r = S_r(\text{Hex}) - C_p(\text{Cy5})$).

Оценку гомозиготной потери экзона 7 гена SMN1 проводили в соответствии с инструкцией набора для ПЦР-детекции (выполняется автоматически программным обеспечением ПЦР-амплификатора).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основанный на ПЦР скрининговый тест был использован для оценки наличия у 341 образца гомозиготной потери гена SMN1. Во всех образцах количество копий генов SMN1 и SMN2 было определено с использованием эталонного метода MLPA. Результаты теста считали истинно положительными, если гомозиготную потерю экзона 7 гена SMN1 обнаруживали в образцах с 0 копиями экзона 7 гена SMN1. Наличие по меньшей мере одного экзона 7 гена SMN1, идентифицированного методом

MLPA, и обнаружение сигнала SMN1 экзона 7 с помощью теста НеоСкрин SMA/TREC/KREC считали истинно отрицательными.

Результаты в группе 1 были следующими. В подгруппе 1 «Норма» 54 участника (26%) имели 2 копии экзона 7 гена SMN1, и все образцы были истинно отрицательными при скрининге набором на основе ПЦР-ПВ. В подгруппе 2 «Делеция», подгруппе 3 «Конверсия», подгруппе 4 «Гибрид» все образцы были истинно положительными ($n = 65$; 32%). В подгруппе 5 «Носитель», состоящей из 51 участника (25%), у всех имелась единственная копия экзона 7 гена SMN1, и все участники были истинно отрицательными. В подгруппе 6 «Дупликация» все 23 образца (11%), содержащие 3 копии экзона 7 гена SMN1, были истинно отрицательными. Подгруппа 7 «Другое» состояла из 13 образцов с различным количеством экзонов генов SMN1 и SMN2. Истинно отрицательными были шесть образцов (3%), содержащие более одной копии экзона 7 гена SMN1. Одну копию гена SMN1 в подгруппе 7 содержали пять образцов, которые тоже были истинно отрицательными (2%). И два участника не имели ни одного из экзонов 7 гена SMN1 и были, соответственно, истинно положительными (1%). Результаты представлены в табл. 4.

В группе 2 результаты теста были следующими. В подгруппе «Норма» 99 образцов (73%) имели две копии экзона 7 гена SMN1, и все образцы были истинно

Таблица 4. Сравнительный анализ результатов, полученных с помощью метода MLPA и теста на основе ПЦР-ПВ в группе 1

Подгруппа	Количество образцов в каждой подгруппе	Результаты MLPA (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена SMN1)			Результаты теста (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена SMN1)		ИП	ЛП	ИО	ЛО
		>1	1	0	Норма (≥ 1)	Делеция (0)				
1. Норма	54	54	0	0	54	0	0	0	54	0
2. Делеция	9	0	0	9	0	9	9	0	0	0
3. Конверсия	47	0	0	47	0	47	47	0	0	0
4. Гибрид	9	0	0	9	0	9	9	0	0	0
5. Носитель	51	0	51	0	51	0	0	0	51	0
6. Дупликация	23	23	0	0	23	0	0	0	23	0
7. Другое	13	6	5	2	11	2	2	0	11	0
Всего	206	83	56	67	139	67	67	0	139	0

Примечание: ИП — истинно положительные; ЛП — ложноположительные; ИО — истинно отрицательные; ЛО — ложноотрицательные.

Таблица 5. Сравнительный анализ результатов, полученных с помощью метода MLPA и теста на основе ПЦР-РВ в группе 2

Подгруппа	Количество образцов в каждой подгруппе	Результаты MLPA (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена <i>SMN1</i>)			Результаты теста (количество образцов зависит от числа копий экзона 7 гена <i>SMN1</i>)		ИП	ЛП	ИО	ЛО
		>1	1	0	Норма (≥ 1)	Делеция (0)				
1. Норма	99	99	0	0	99	0	0	0	99	0
2. Делеция	3	0	0	3	0	3	3	0	0	0
3. Конверсия	13	0	0	13	0	13	13	0	0	0
4. Гибрид	2	0	0	2	0	2	2	0	0	0
5. Носитель	9	0	9	0	9	0	0	0	9	0
6. Дупликация	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7. Другое	9	0	8	1	8	1	1	0	8	0
Всего	135	99	17	19	116	19	19	0	116	0

Примечание: ИП — истинно положительные; ЛП — ложноположительные; ИО — истинно отрицательные; ЛО — ложноотрицательные.

отрицательными. В подгруппе «Делеция», подгруппе «Конверсия», подгруппе «Гибрид» все образцы были истинно положительными при скрининге с помощью ПЦР-РВ ($n = 18; 13,3\%$). Группа 2 не содержала образцов с дупликацией гена *SMN1* согласно результатам анализа MLPA. В подгруппе «Носитель» все девять проб (7%) были истинно отрицательными. В подгруппе «Другие» один образец (0,7%) был истинно положительным на наличие гомозиготной потери экзона 7 гена *SMN1*. И восемь образцов (6%) содержали одну копию гена *SMN1*, и все участники были истинно отрицательными при скрининге с помощью ПЦР-РВ. Все результаты представлены в табл. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Спинальная мышечная атрофия — аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание, основным клиническим проявлением которого является прогрессирующее тяжелое поражение проксимальной скелетной мускулатуры. Основная характеристика теста для выявления 5q-CMA при неонатальном скрининге — возможность детектирования всех форм потери гена *SMN1* как в образцах ДНК, выделенных из цельной крови, так и образцах ДНК, полученных из сухих пятен крови.

Существуют различные методологические подходы к детекции гомозиготной потери гена *SMN1*, однако для неонатального скрининга на CMA лучше всего зарекомендовали себя различные модификации метода ПЦР в реальном времени [16, 21]. Это связано с их высокой эффективностью, характеризующейся крайне низким количеством ложноположительных и ложноотрицательных результатов, относительно низкой трудоемкостью и себестоимостью, а также возможностью проведения исследований по ДНК из сухих пятен крови [2, 22]. Тест основан на технологии ПЦР и детектирует гомозиготную потерю экзона 7 гена *SMN1* [6].

Ген *SMN1* расположен в очень нестабильном регионе генома, насыщенном повторяющимися инвертированными генами и богатым Alu-последовательностями, что обуславливает появление широкого спектра генетических изменений гена *SMN1*. Для подтверждения специфичности выявления гомозиготной потери гена *SMN1* с помощью ПЦР-РВ в группе 1, состоящей из образцов ДНК, выделенных и очищенных из цельной крови, была отобрана гетерогенная подгруппа из 139 образцов с количеством копий гена *SMN1*, равным 1–3 копии (подгруппы «Норма», «Носитель», «Дупликация», 11 участников из подгруппы «Другое»). По

итогах молекулярно-генетического тестирования во всех 139 образцах были получены отрицательные результаты на гомозиготную потерю гена *SMN1*. Это подчеркивает, что доброкачественное изменение копийности гена *SMN1* не влияет на эффективность выявления гомозиготной потери гена *SMN1* при скрининге.

Главной задачей неонатального скрининга на 5q-CMA является детекция случаев гомозиготной потери гена *SMN1*. В группе 1 все участники исследования с делецией гена *SMN1*, конверсией, гибридными генами, а также иными формами генотипа в количестве двух пациентов (общее количество 67) дали положительный результат в ходе скрининга на гомозиготную потерю гена *SMN1*. Набор продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность выявления гомозиготной потери гена *SMN1*. Это согласуется с рядом исследований, посвященных методологической проблеме скрининга 5q-CMA [2, 23].

Для подтверждения эффективности теста для выявления гомозиготной потери гена *SMN1* в образцах ДНК, выделенных из сухих пятен крови, были отобраны образцы в группу 2. Во всех образцах из данной группы с 1–3 копиями гена *SMN1* ($n = 116$) результаты применения теста были отрицательными на гомозиготную потерю гена *SMN1*. Это подчеркивает, что изменение числа копий генов *SMN1* не влияет на специфичность обнаружения гомозиготной потери гена *SMN1* в ДНК, выделенной из образцов сухих пятен крови. Результаты скрининга на гомозиготную потерю гена *SMN1* набором, основанным на ПЦР-РВ, были положительными у всех пациентов в образцах сухих пятен крови, у которых была обнаружена гомозиготная потеря гена *SMN1* с помощью метода MLPA.

Ограничением данного набора является отсутствие возможности выявления редких форм 5q-CMA, ассоциированных с гетерозиготной потерей гена *SMN1* и точечными патогенными вариантами на сохранившейся копии гена (сложные или компаунд гетерозиготы). По результатам исследований, распространенность данной формы 5q-CMA составляет до 5% от всех случаев [3]. Однако нужно отметить, что на данный момент ни в одной стране мира не проводится скрининг на данный подтип заболевания [4]. При выявлении клинических признаков 5q-CMA и отрицательном результате скрининга на гомозиготную потерю гена *SMN1* требуется расширенное исследование на обнаружение потери гена *SMN1* на одном аллеле в сочетании с точечными мутациями гена *SMN1* другого аллеля.

ВЫВОДЫ

Пилотное исследование показало, что набор на основе ПЦР-РВ способен обнаруживать гомозиготную потерю гена

SMN1 в образцах ДНК, выделенных как из цельной крови, так и из сухих пятен крови. Согласно результатам настоящего исследования, набор обнаруживает также все возможные молекулярные формы гомозиготной потери гена *SMN1*.

Литература

- Butchbach MER. Genomic variability in the survival motor neuron genes (SMN1 and SMN2): Implications for spinal muscular atrophy phenotype and therapeutics development. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (15): 7896. DOI: 10.3390/ijms22157896.
- Chien YH, Chiang SC, Weng WC, Lee NC, Lin CJ, Hsieh WS, et al. Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Through Newborn Screening. *J Pediatr.* 2017; 190: 124–129. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.06.042.
- Nicolau S, Waldrop MA, Connolly AM, Mendell JR. Spinal Muscular Atrophy. *Semin Pediatr Neurol.* 2021; 37: 100878. DOI: 10.1016/j.spen.2021.100878.
- Clermont O, Bulet P, Benit P, Chanterau D, Saugier-veber P, Munnich A, et al. Molecular analysis of SMA patients without homozygous SMN1 deletions using a new strategy for identification of SMN1 subtle mutations. *Hum Mutat.* 2004; 24 (5): 417–27. DOI: 10.1002/humu.20092.
- Zabnenkova VV, Dadali EL, Spiridonova MG, Zinchenko RA, Polyakov AV. Spinal muscular atrophy carrier frequency in Russian Federation. *ASHG.* 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.16245.60642.
- Arnold ES, Fischbeck KH. Spinal muscular atrophy. *Handb Clin Neurol.* 2018; 148: 591–601. DOI: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00038-7.
- Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации «Проксимальная спинальная мышечная атрофия 5q». М., 2023.
- Gambardella A, Mazzei R, Toscano A, Annesi G, Pasqua A, Annesi F, et al. Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene. *Ann Neurol.* 1998; 44 (5): 836–39. DOI: 10.1002/ana.410440522.
- Stabley DL, Holbrook J, Scavina M, Crawford TO, Swoboda KJ, Robbins KM, et al. Detection of SMN1 to SMN2 gene conversion events and partial SMN1 gene deletions using array digital PCR. *Neurogenetics.* 2021; 22 (1): 53–64. DOI: 10.1007/s10048-020-00630-5.
- Niba ETE, Nishio H, Wijaya YOS, Lai PS, Tozawa T, Chiyonobu T, et al. Clinical phenotypes of spinal muscular atrophy patients with hybrid SMN gene. *Brain Dev.* 2021; 43 (2): 294–302. DOI: 10.1016/j.braindev.2020.09.005.
- Lutz CM, Kary S, Patrini S, Osborne MA, Liu D, Henderson CE, et al. Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *J Clin Invest.* 2011; 121 (8): 3029–41. DOI: 10.1172/JCI57291.
- Comley LH, Kline RA, Thomson AK, Woschitz V, Landeros EV, Osman EY, et al. Motor unit recovery following Smn restoration in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2022; 31 (18): 3107–19. DOI: 10.1093/hmg/ddac097.
- De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu WL, Crawford TO, Finkel RS, et al. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord.* 2019; 29 (11): 842–56. DOI: 10.1016/j.nmd.2019.09.007.
- Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, et al. Onasemnogene abeparovovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med.* 2022; 28 (7): 1390–7. DOI: 10.1038/s41591-022-01867-3.
- Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 274n dated 21.04.2022 "On approval of the Procedure for providing medical care to patients with congenital and (or) hereditary diseases".
- Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 3245–76. DOI: 10.3390/ijms13033245.
- Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord.* 2006; 16: 830–38.
- Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet.* 2002; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
- Gómez-Curet I, Robinson KG, Funanage VL, Crawford TO, Scavina M, Wang W. Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time TaqMan PCR. *Neurogenetics.* 2007; 8 (4): 271–8. DOI: 10.1007/s10048-007-0093-1.
- Gutierrez-Mateo C, Timonen A, Vaahtera K, Jaakkola M, Hougaard DM, Bybjerg-Grauholm J. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Newborn Screening of SCID, SMA, and XLA. *Int J Neonatal Screen.* 2019; 5 (4): 39. DOI: 10.3390/ijns5040039.
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Bulet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995; 80 (1): 155–65. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90460-3.
- Kraszewski JN, Kay DM, Stevens CF, Koval C, Haser B, Ortiz V, et al. Pilot study of population-based newborn screening for spinal muscular atrophy in New York state. *Genet Med.* 2018; 20 (6): 608–13. DOI: 10.1038/gim.2017.152.
- Kariyawasam DST, Russell JS, Wiley V, Alexander IE, Farrar MA. The implementation of newborn screening for spinal muscular atrophy: the Australian experience. *Genet Med.* 2020; 22 (3): 557–65. DOI: 10.1038/s41436-019-0673-0.

References

- Butchbach MER. Genomic variability in the survival motor neuron genes (SMN1 and SMN2): Implications for spinal muscular atrophy phenotype and therapeutics development. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (15): 7896. DOI: 10.3390/ijms22157896.
- Chien YH, Chiang SC, Weng WC, Lee NC, Lin CJ, Hsieh WS, et al. Presymptomatic Diagnosis of Spinal Muscular Atrophy Through Newborn Screening. *J Pediatr.* 2017; 190: 124–129. DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.06.042.
- Nicolau S, Waldrop MA, Connolly AM, Mendell JR. Spinal Muscular Atrophy. *Semin Pediatr Neurol.* 2021; 37: 100878. DOI: 10.1016/j.spen.2021.100878.
- Clermont O, Bulet P, Benit P, Chanterau D, Saugier-veber P, Munnich A, et al. Molecular analysis of SMA patients without homozygous SMN1 deletions using a new strategy for identification of SMN1 subtle mutations. *Hum Mutat.* 2004; 24 (5): 417–27. DOI: 10.1002/humu.20092.
- Zabnenkova VV, Dadali EL, Spiridonova MG, Zinchenko RA, Polyakov AV. Spinal muscular atrophy carrier frequency in Russian Federation. *ASHG.* 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.16245.60642.
- Arnold ES, Fischbeck KH. Spinal muscular atrophy. *Handb Clin Neurol.* 2018; 148: 591–601. DOI: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00038-7.

7. Ministerstvo zdravooxraneniya Rossijskoj Federacii. Klinicheskie rekomendacii «Proksimal'naya spinal'naya myshechnaya atrofiya 5q». M., 2023. Russian.
8. Gambardella A, Mazzei R, Toscano A, Annesi G, Pasqua A, Annesi F, et al. Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene. *Ann Neurol*. 1998; 44 (5): 836–39. DOI: 10.1002/ana.410440522.
9. Stabley DL, Holbrook J, Scavina M, Crawford TO, Swoboda KJ, Robbins KM, et al. Detection of SMN1 to SMN2 gene conversion events and partial SMN1 gene deletions using array digital PCR. *Neurogenetics*. 2021; 22 (1): 53–64. DOI: 10.1007/s10048-020-00630-5.
10. Niba ETE, Nishio H, Wijaya YOS, Lai PS, Tozawa T, Chiyonobu T, et al. Clinical phenotypes of spinal muscular atrophy patients with hybrid SMN gene. *Brain Dev*. 2021; 43 (2): 294–302. DOI: 10.1016/j.braindev.2020.09.005.
11. Lutz CM, Kariy S, Patrui S, Osborne MA, Liu D, Henderson CE, et al. Postsymptomatic restoration of SMN rescues the disease phenotype in a mouse model of severe spinal muscular atrophy. *J Clin Invest*. 2011; 121 (8): 3029–41. DOI: 10.1172/JCI57291.
12. Comley LH, Kline RA, Thomson AK, Woschitz V, Landeros EV, Osman EY, et al. Motor unit recovery following Smn restoration in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 2022; 31 (18): 3107–19. DOI: 10.1093/hmg/ddac097.
13. De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu WL, Crawford TO, Finkel RS, et al. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord*. 2019; 29 (11): 842–56. DOI: 10.1016/j.nmd.2019.09.007.
14. Strauss KA, Farrar MA, Muntoni F, Saito K, Mendell JR, Servais L, et al. Onasemnogene abeparvovec for presymptomatic infants with three copies of SMN2 at risk for spinal muscular atrophy: the Phase III SPR1NT trial. *Nat Med*. 2022; 28 (7): 1390–7. DOI: 10.1038/s41591-022-01867-3.
15. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 274n dated 21.04.2022 "On approval of the Procedure for providing medical care to patients with congenital and (or) hereditary diseases".
16. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA Assay in the Molecular Diagnosis of Gene Copy Number Alterations in Human Genetic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2012; 13: 3245–76. DOI: 10.3390/ijms13033245.
17. Arkblad EL, Darin N, Berg K, Kimber E, Brandberg G, Lindberg C, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification improves diagnostics in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2006; 16: 830–38.
18. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 2002; 70 (2): 358–68. DOI: 10.1086/338627.
19. Gómez-Curet I, Robinson KG, Funanage VL, Crawford TO, Scavina M, Wang W. Robust quantification of the SMN gene copy number by real-time TaqMan PCR. *Neurogenetics*. 2007; 8 (4): 271–8. DOI: 10.1007/s10048-007-0093-1.
20. Gutierrez-Mateo C, Timonen A, Vaahtera K, Jaakkola M, Hougaard DM, Bybjerg-Grauholm J. Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Newborn Screening of SCID, SMA, and XLA. *Int J Neonatal Screen*. 2019; 5 (4): 39. DOI: 10.3390/ijns5040039.
21. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995; 80 (1): 155–65. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90460-3.
22. Kraszewski JN, Kay DM, Stevens CF, Koval C, Haser B, Ortiz V, et al. Pilot study of population-based newborn screening for spinal muscular atrophy in New York state. *Genet Med*. 2018; 20 (6): 608–13. DOI: 10.1038/gim.2017.152.
23. Kariyawasam DST, Russell JS, Wiley V, Alexander IE, Farrar MA. The implementation of newborn screening for spinal muscular atrophy: the Australian experience. *Genet Med*. 2020; 22 (3): 557–65. DOI: 10.1038/s41436-019-0673-0.

САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 1-ГО ТИПА: ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Е. В. Ганцгорн [✉], О. В. Денисенко, Я. О. Осипенко, Д. А. Калмыкова, А. В. Иванов, С. С. Герасюта, Г. А. Булгурян, М. Х. Иванова, Д. А. Саакян

Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, Россия

Диабет 1-го типа — это состояние, вызванное аутоиммунным повреждением инсулин-продуцирующих β-клеток островков поджелудочной железы, приводящее к эндогенному дефициту инсулина. Несмотря на достаточную изученность заболевания и наличие клинических рекомендаций по проведению заместительной терапии, количество больных с данной патологией растет по всему миру. При этом их когорта очень неоднородна, в том числе ввиду различной этиологии, сопутствующего генетического фона, вариаций манифестации заболевания и степени тяжести. В связи с этим традиционные представления о сахарном диабете 1-го типа ставятся под сомнение, что требует особого внимания при ведении пациентов с клинической картиной заболевания, отличающейся от традиционной. В статье представлен клинический случай течения сахарного диабета 1-го типа у молодого пациента, который демонстрирует важность персонализированного подхода к диагностике и лечению больных сахарным диабетом с «неклассическим» анамнезом.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, аутоиммунный диабет взрослых, дифференциальная диагностика, диабетическая нейропатия

Вклад авторов: Е. В. Ганцгорн — концепция, интерпретация результатов, научное редактирование; О. В. Денисенко, Я. О. Осипенко — анализ литературы, анализ данных, интерпретация результатов, написание статьи; Д. А. Калмыкова, А. В. Иванов, С. С. Герасюта, Г. А. Булгурян, М. Х. Иванова, Д. А. Саакян — анализ литературы, анализ данных.

Соблюдение этических стандартов: пациент подписал добровольное информированное согласие на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

✉ **Для корреспонденции:** Елена Владимировна Ганцгорн
ул. 1-я Майская, д. 8/10, кв. 16, г. Ростов-на-Дону, 344019; Россия; gantsgorn@inbox.ru

Статья получена: 13.05.2023 **Статья принята к печати:** 14.06.2023 **Опубликована онлайн:** 26.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.023

TYPE 1 DIABETES MELLITUS: FEATURES OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS

Gantsgorn EV [✉], Denisenko OV, Osipenko YaO, Kalmykova DA, Ivanov AV, Gerasyuta SS, Bulguryan GA, Ivanova MH, Saakyan DA

Rostov State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russia

Type 1 diabetes mellitus is a condition caused by autoimmune damage to insulin-producing beta cells of the pancreatic islets, leading to endogenous insulin deficiency. Despite the sufficient knowledge of the disease and the availability of clinical recommendations for substitution therapy, the number of patients with this pathology is growing worldwide. At the same time, their cohort is very heterogeneous, including amid different etiology, concomitant genetic background, variations in the manifestation of the disease and severity. In this regard, traditional ideas about type 1 diabetes mellitus are being questioned, which requires special attention when managing patients with a clinical picture of the disease that differs from the traditional one. The article presents a clinical case of type 1 diabetes mellitus in a young patient, which demonstrates the importance of a personalized approach to the diagnosis and treatment of diabetic patients with a "non-classical" history.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, latent autoimmune diabetes in adults, differential diagnosis, diabetic neuropathy

Author contribution: Gantsgorn EV — study concept, interpretation of results, manuscript editing; Denisenko OV, Osipenko YaO — literature analysis, data analysis, interpretation of results, manuscript writing; Kalmykova DA, Ivanov AV, Gerasyuta SS, Bulguryan GA, Ivanova MH, Saakyan DA — literature analysis, data analysis.

Compliance with ethical standards: the patient signed a voluntary informed consent to the publication of personal medical information in an anonymized form.

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena V. Gantsgorn
1-ja Mayskaya, 8/10, 16, Rostov-on-Don, 344019, Russia; gantsgorn@inbox.ru

Received: 13.05.2023 **Accepted:** 14.06.2023 **Published online:** 26.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.023

Сахарный диабет 1-го типа (СД1) продолжает оставаться одной из глобальных медико-социальных проблем ввиду своей широкой распространенности, полиморфизма, развития тяжелых осложнений и необратимости изменений. Численность пациентов в РФ с СД1 на начало 2023 г. составила 277 092 [1].

Несмотря на высокую степень изученности СД1 и имеющиеся традиционные парадигмы диагностики и подходов к лечению, не всегда удается правильно диагностировать данный тип СД, что связано с вариабельным началом и течением, присутствием «неклассических» проявлений, а также существованием промежуточных форм заболевания, совмещающих в себе клинические признаки СД1 и СД 2-го типа (СД2), например, таких как латентный аутоиммунный диабет взрослых (LADA, от англ. *latent autoimmune diabetes in adults*) [2]. Эти факторы обуславливают и недостатки в лечении, ведь у

большинства людей, страдающих СД1, не оптимизирован гликемический профиль [3].

В представленном нами клиническом наблюдении показана клиническая картина течения СД1 с «неклассическим» анамнезом и акцентировано внимание на необходимости диагностического поиска и индивидуального подхода к ведению пациента.

Описание клинического случая

Первичная госпитализация

Пациент Х., 26 лет, 12.08.2022 поступил в приемное отделение БСМП с жалобами на общую слабость, сухость во рту, жажду, утомляемость. В ходе первичного обследования были выявлены: гипергликемия — 17 ммоль/л, глюкозурия, кетонурия. Пациент был

Таблица 1. Оценка уровня гликемии (ммоль/л) глюкометром на фоне инсулинотерапии (инсулин растворимый + инсулин-изофан) в период с 13.08.2022 по 22.08.2022

Дата	Перед завтраком	Через 2 ч после еды	Перед обедом	Через 2 ч после еды	Перед ужином	Через 2 ч после еды	На ночь
13.08.2022	15,7	16,1	12,5	13,6	11,0	13,2	12,1
14.08.2022	12,0	13,2	11,9	14,5	9,8	14,0	11,2
15.08.2022	10,9	11,8	10,5	9,3	10,0	10,9	9,1
16.08.2022	8,9	10,5	9,2	8,9	10,0	11,4	10,2
17.08.2022	11,3	10,5	9,3	9,8	10,1	11,3	9,2
18.08.2022	10,8	11,0	8,7	9,5	9,1	10,0	8,1
19.08.2022	8,8	9,1	7,3	8,8	7,9	9,1	8,5
20.08.2022	7,9	8,0	7,1	8,1	5,8	7,5	5,6
21.08.2022	7,7	8,3	6,0	7,2	5,8	6,3	5,3
22.08.2022	6,3	7,1	5,8	6,8	9,1	6,3	5,5

госпитализирован в терапевтическое отделение больницы с предварительным диагнозом «Сахарный диабет 1-го типа» с целью дополнительного обследования и подбора сахароснижающей терапии.

Со слов больного, эпизоды гипергликемии до 8–9 ммоль/л выявлялись ранее на медицинских профилактических осмотрах в течение двух лет, однако он не придавал этому значения, ссылаясь на нарушения правил сдачи анализов. Кроме этого, в течение двух месяцев перед обращением в больницу пациент отмечал повышенную жажду и потерю веса в 5 кг. За медицинской помощью не обращался.

Из анамнеза жизни известно, что пациент развивался соответственно полу и возрасту, вредных привычек не имеет. Хронические заболевания и отягощенный наследственный анамнез, в том числе и по эндокринопатии, отсутствуют.

Объективно: рост — 190 см, вес — 84 кг. Индекс массы тела (ИМТ) — 23,3 кг/м². Кожные покровы и видимые слизистые оболочки обычной окраски и влажности, тургор кожи сохранен. Щитовидная железа не пальпируется. Периферических отеков нет. Тоны сердца ясные, ритмичные. Частота сердечных сокращений (ЧСС) — 65 уд./мин, артериальное давление (АД) — 120/80 мм рт. ст. Дыхание аускультативно везикулярное с обеих сторон. Перкуторно — ясный легочный звук. Частота дыхательных движений (ЧДД) — 16 в минуту. Живот правильной формы, участвует в акте дыхания, при пальпации — мягкий, безболезненный. Стул оформленный, без патологических примесей. Акт мочеиспускания свободный, безболезненный. Почки не пальпируются. Симптом «поколачивания» (Пастернацкого) отрицателен с обеих сторон.

1. Общий анализ крови (ОАК) от 12.08.2022: без патологических изменений.

2. Общий анализ мочи (ОАМ) от 12.08.2022: глюкозурия (+++), кетонурия (+), гиперстенурия (1,028 г/л).

3. Биохимический анализ крови: гипергликемия: 12.08.2022 — 17,5 ммоль/л, 19.08.2022 — 18,3 ммоль/л, 20.08.2022 — 7,7 ммоль/л, 23.08.2022 — 6,8 ммоль/л. Гликированный гемоглобин (HbA1c) — 10,5%. Показатели белкового обмена, фракции билирубина, железа, аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), щелочная фосфатаза, креатинин, мочевины, мочевая кислота, С-реактивный белок, ионы Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ в пределах нормы.

4. Липидограмма: холестерин общий — 4,9 ммоль/л, триглицериды (ТГ) — 1,8 ммоль/л, липопротеины высокой плотности (ЛПВП) — 1,40 ммоль/л, липопротеины низкой плотности (ЛПНП) — 3,1 ммоль/л, липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) — 0,8 ммоль/л, индекс атерогенности — 2,5.

5. Показатели коагулограммы — в пределах нормы.

6. При анализе кислотно-щелочного равновесия патологических изменений не выявлено.

7. Рассчитана скорость клубочковой фильтрации (СКФ): 123,81 мл/мин/1,73 м².

Пациент находился на лечении в терапевтическом отделении с 12.08.2022 по 24.08.2022.

Пациенту проводилось лечение в виде базис-болюсной инсулинотерапии: инсулин растворимый и инсулин-изофан.

В течение всего времени лечения проводили контроль глюкозы крови (табл. 1). Больной был выписан с диагнозом: сахарный диабет 1-го типа, впервые выявленный, целевой уровень HbA1c < 6,5%. Было рекомендовано продолжить лечение инсулином аспарт подкожно (п/к) по 10–12 Ед. перед приемами пищи и инсулином гларгин п/к по 30 Ед. вечером 1 раз в день под контролем уровня гликемии с возможной корректировкой дозы, а также осуществлять ведение дневника самоконтроля уровня глюкозы крови и придерживаться диеты с ограничением легкоусвояемых углеводов. Было проведено профилактическое консультирование по вопросам лечения, однако обучение в Школе диабета не осуществлялось.

Через несколько дней после выписки пациента стали беспокоить жажда, сухость во рту, учащенное мочеиспускание, чувство ползания мурашек в области стоп. В течение недели уровень глюкозы снова начал повышаться и находился в пределах 10–13 ммоль/л.

Повторная госпитализация

Пациент был госпитализирован 30.08.2022 в терапевтическое отделение в дневной стационар с учетом клинко-лабораторной декомпенсации СД.

При поступлении: рост — 190 см, вес — 82 кг, ИМТ — 22,7 кг/м². АД — 115/68 мм рт. ст., ЧСС — 71 уд./мин, ЧДД — 17 в мин. Других изменений в объективном статусе пациента по сравнению с осмотром 12.08.22 не обнаружено. ОАК, ОАМ, липидограмма, коагулограмма — в пределах нормы. В биохимическом анализе выявлена глюкозурия — 13,9 ммоль/л, остальные параметры

Таблица 2. Оценка уровня гликемии (ммоль/л) глюкометром на фоне инсулинотерапии (глулизин + деглудек) в период с 31.08.2022 по 09.09.2022

Дата	Перед завтраком	Через 2 ч после еды	Перед обедом	Через 2 ч после еды	Перед ужином	Через 2 ч после еды	На ночь
31.08.2022	10,1	12,5	8,3	13,0	10,0	10,8	7,9
01.09.2022	8,8	15,6	12,0	13,2	9,8	10,2	9,3
02.09.2022	7,9	10,2	9,8	9,5	7,6	8,1	7,8
03.09.2022	7,1	9,2	7,9	8,1	6,9	7,1	6,1
04.09.2022	6,3	7,5	5,9	7,1	5,6	7,8	5,6
05.09.2022	5,3	6,8	5,5	7,5	6,3	7,0	5,5
06.09.2022	5,6	7,0	6,0	6,9	5,8	7,1	5,8
07.09.2022	5,3	5,9	6,3	6,9	5,3	6,2	4,9
08.09.2022	5,6	6,9	5,0	5,2	5,3	6,2	5,4
09.09.2022	5,4	6,5	4,8	-	-	-	-

без отклонений. Уровень HbA1c от 30.08.2022 — 10,5%. Гликемический профиль от 30.08.2022 (венозная кровь): 13,49 ммоль/л (натощак); 17,4 ммоль/л — через 2 ч после еды, через 4 ч — 16,6 ммоль/л.

На УЗИ органов брюшной полости от 31.08.2022 патологии не выявлена.

В связи с наличием жалоб на чувство «ползания мурашек» в области стоп была проведена консультация невролога. Было выявлено симметричное снижение рефлексов с сухожилия двуглавой мышцы плеча, карпорадиального, коленного, резкое снижение Ахиллова рефлекса, нарушение поверхностной чувствительности по полиневритическому типу (по типу «чулок» от уровня нижней трети голени). При оценке по шкале симптомов нейропатии (NSS) сумма баллов была равна 4, что соответствует умеренной нейропатии [4]. Заключение: диабетическая дистальная полинейропатия, сенсорная форма, умеренные проявления.

В течение всего времени пребывания больного в стационаре проводили контроль углеводного обмена (табл. 2).

Пациент получал лечение инсулином деглудек 25 Ед в 22.00, инсулином глулизин из расчета 1 хлебная единица (ХЕ): 2 Ед перед приемами пищи для устранения сохраняющейся постпрандиальной гипергликемии.

Начиная с 05.09.2022 уровень глюкозы начал постепенно приближаться к целевым, 09.09.2022 составив 5,4 ммоль/л натощак и 6,5 ммоль/л через 2 ч после приема пищи.

С целью верификации диагноза пациенту было рекомендовано выполнить исследование на наличие аутоантител к глутаматдекарбоксилазе (GAD) и островковым клеткам (ICA). Результат от 09.09.2022: GADA — более 1000 МЕ/мл; ICA — 256 Ед/мл.

Окончательный диагноз: сахарный диабет 1-го типа, целевой уровень HbA1c < 6,5%. Осложнения основного диагноза: диабетическая дистальная полинейропатия, сенсорная форма, умеренные нарушения.

Пациент был выписан 10.09.2022. Для продолжения лечения ему был назначен инсулин деглудек по 25 Ед вечером в 22.00, инсулин глулизин из расчета 1 ХЕ : 2 Ед перед приемами пищи.

Обсуждение клинического случая

В данном клиническом случае диагноз СД1 был более вероятен, так как характерные жалобы пациента

(слабость, сухость во рту, жажда, утомляемость), гипергликемия, глюкозурия, кетонурия, потеря в весе за последние 2 месяца, возраст < 30 лет и ИМТ < 25 кг/м², отсутствие признаков метаболического синдрома указывают на данное патологическое состояние. Однако медленное прогрессирование СД, отсутствие острого начала, аутоиммунных заболеваний и предрасполагающих факторов не совсем характерны для «классического» инсулинзависимого диабета. Эти характеристики наблюдаются и при СД2, и, в совокупности с началом в молодом возрасте и нормальным весом, — при LADA [2, 5]. Из-за несоответствия данных признаков возникает необходимость в проведении расширенной дифференциальной диагностики.

С этой целью был выполнен иммуноферментный анализ на наличие антител к GAD и ICA. Полученный положительный результат опровергает наличие СД2, но не исключает LADA. Однако СД1 у молодых пациентов имеет большую иммуногенную нагрузку с более быстрым поражением β-клеток и высокой потребностью в инсулине [2, 6–8], что наблюдалось в описанном клиническом случае. Этот факт может быть подтвержден определением резко сниженных уровней С-пептида при СД1, чем при LADA, при котором данный показатель снижается постепенно [9, 10].

Анамнестические данные указывают на сходство с LADA-диабетом, однако высокая концентрация аутоантител, свидетельствующая о быстро прогрессирующем снижении функции β-клеток с развитием острого гипергликемического состояния, больше подходит к фенотипу СД1. Существует также классификация, которая выделяет стадии в развитии СД1, в том числе и с бессимптомным началом [2, 11]. В уточнении диагноза может помочь HLA-генотипирование, так как исследования описывают различия в генетическом профиле пациентов с LADA и СД1 по частоте предрасполагающих, протективных генотипов и гаплотипов [12, 13]. Однако данный метод не является рутинным, и его не используют для диагностики в обычной клинической практике, в связи с чем основную роль в таком диагностическом поиске будет играть клиническая картина.

Одной из особенностей данного случая является быстрое развитие осложнений СД: диабетическая дистальная нейропатия диагностирована почти сразу после установления диагноза. Такое быстрое прогрессирование осложнений встречается редко. Описаны несколько случаев раннего начала полинейропатии [14, 15]. Возможен вариант, при котором симптомы полинейропатии появлялись и ранее, как и эпизоды гипергликемии,

но пациент не предъявлял жалоб до развития более серьезных нарушений.

Установление типа диабета и учет «неклассической» симптоматики необходимы для правильного подбора инсулинотерапии, особенно в связи с тем, что у пациента наблюдалась декомпенсация сахарного диабета, не сразу удалось достигнуть стойкой тенденции к снижению гликемии и уже имеются осложнения. Так как недостаточность функции β -клеток выраженная, инсулинотерапия является верной тактикой лечения. Однако повторная госпитализация с ухудшением состояния и стойкой гипергликемией может указывать как на низкую приверженность пациента к лечению между госпитализациями, так и на неподходящие дозировки инсулина, в связи с чем были изменены препараты и режим терапии. Важность дифференциальной диагностики подтверждается в аспекте того, что при отнесении данного случая к LADA-диабету возможна была бы комбинированная терапия с сахароснижающими пероральными препаратами при наличии остаточной функции β -клеток, для оценки которой рекомендовано определение С-пептида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая все имеющиеся данные, можно утверждать, что в описанном клиническом случае наиболее вероятен диагноз СД1. Однако, на наш взгляд, в подобных «неклассических» клинических ситуациях целесообразно проведение наиболее широкой клинико-лабораторной и инструментальной диагностики СД: определение уровня С-пептида для точной верификации диагноза, оценки прогрессирования диабета; выполнение электромиографии для исключения других причин нейропатических симптомов; консультация офтальмолога для поиска других возможных микрососудистых осложнений. Важным представляются контроль и поддержание на достаточном уровне комплаентности пациента. Представленное нами клиническое наблюдение указывает на важность индивидуального подхода к ведению пациентов с СД1, особенно при наличии схожих признаков с другими типами СД, для своевременной корректировки терапии и предотвращения прогрессирования, развития осложнений.

Литература

1. Федеральный Регистр сахарного диабета РФ; 2023 [Электронный ресурс] [дата обращения: 11.06.2023]. Доступно по ссылке: <https://sd.diaregistry.ru/content/o-proekte.html#content>.
2. Buzzetti R, Tuomi T, Mauricio D, Pietropaolo M, Zhou Z, Pozzilli P, et al. Management of latent autoimmune diabetes in adults: a consensus statement from an international expert panel. *Diabetes*. 2020; 69 (10): 2037–47. PMID: 32847960; PMCID: PMC7809717.7.
3. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018; 391 (10138): 2449–62. PMID: 29916386; PMCID: PMC6661119.
4. Meijer JW, Smit AJ, Sonderer EV, Groothoff JW, Eisma WH, Links TP. Symptom scoring systems to diagnose distal polyneuropathy in diabetes: the diabetic neuropathy symptom score. *Diabet Med*. 2002; 19 (11): 962–5. PMID: 12421436.
5. Furlanos S, Perry C, Stein MS, Stankovich J, Harrison LC, Colman PG. A clinical screening tool identifies autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care*. 2006; 29 (5): 970–5. PMID: 16644622.
6. Peralice S, Pozzilli P. Latent autoimmune diabetes in adults: a review on clinical implications and management. *Diabetes Metab J*. 2018; 42 (6): 451–64. PMID: 30565440; PMCID: PMC6300440.
7. Zampetti S, Capizzi M, Spoletini M, Campagna G, Leto G, Cipolloni L, et al. GADA titer-related risk for organ-specific autoimmunity in LADA subjects subdivided according to gender (NIRAD study 6). *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97 (10): 3759–65. PMID: 22865904.
8. Leslie RD, Williams R, Pozzilli P. Clinical review: Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: one end of the rainbow. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91 (5): 1654–9. PMID: 16478821.
9. Hernandez M, Mollo A, Marsal JR, Esquerda A, Capel I, Puig-Domingo M, et al. Insulin secretion in patients with latent autoimmune diabetes (LADA): half way between type 1 and type 2 diabetes: action LADA 9. *BMC Endocr Disord*. 2015; 15: 1. PMID: 25572256; PMCID: PMC4297398.
10. American Diabetes Association Professional Practice Committee; 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. *Diabetes Care*. 2022; 45 (Supplement 1): S17–S38.
11. Akil AA, Yassin E, Al-Maraghi A, Aliyev E, Al-Malki K, Fakhro KA. Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era. *J Transl Med*. 2021; 19 (1): 137. PMID: 33794915; PMCID: PMC8017850.
12. Тимакова А. А., Салтыков Б. Б. Особенности развития латентного диабета взрослых (LADA). *Архив патологии*. 2019; 81 (4): 78–82.
13. Hernández M, Nóvoa-Medina Y, Faner R, Palou E, Esquerda A, Castelblanco E, et al. Genetics: Is LADA just late onset type 1 diabetes? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022; 13: 916698. PMID: 36034444; PMCID: PMC9404871.
14. Said G, Goulon-Goeau C, Slama G, Tchobroutsky G. Severe early-onset polyneuropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. A clinical and pathological study. *N Engl J Med*. 1992; 326 (19): 1257–63. PMID: 1560802.
15. Shafi OM, Latief M. Early onset symptomatic neuropathy in a child with Type 1 Diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017; 11 (Suppl 1): S477–S479.

References

1. Federal'nyj Registr saxarnogo diabeta RF; 2023 [Elektronnyj resurs] [data obrashheniya: 11.06.2023]. Dostupno po ssylke: <https://sd.diaregistry.ru/content/o-proekte.html#content>. Russian.
2. Buzzetti R, Tuomi T, Mauricio D, Pietropaolo M, Zhou Z, Pozzilli P, et al. Management of latent autoimmune diabetes in adults: a consensus statement from an international expert panel. *Diabetes*. 2020; 69 (10): 2037–47. PMID: 32847960; PMCID: PMC7809717.7.
3. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018; 391 (10138): 2449–62. PMID: 29916386; PMCID: PMC6661119.
4. Meijer JW, Smit AJ, Sonderer EV, Groothoff JW, Eisma WH, Links TP. Symptom scoring systems to diagnose distal polyneuropathy in diabetes: the diabetic neuropathy symptom score. *Diabet Med*. 2002; 19 (11): 962–5. PMID: 12421436.
5. Furlanos S, Perry C, Stein MS, Stankovich J, Harrison LC, Colman PG. A clinical screening tool identifies autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care*. 2006; 29 (5): 970–5. PMID: 16644622.
6. Peralice S, Pozzilli P. Latent autoimmune diabetes in adults: a review on clinical implications and management. *Diabetes Metab*

- J. 2018; 42 (6): 451–64. PMID: 30565440; PMCID: PMC6300440.
7. Zampetti S, Capizzi M, Spoletini M, Campagna G, Leto G, Cipolloni L, et al. GADA titer-related risk for organ-specific autoimmunity in LADA subjects subdivided according to gender (NIRAD study 6). *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97 (10): 3759–65. PMID: 22865904.
 8. Leslie RD, Williams R, Pozzilli P. Clinical review: Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: one end of the rainbow. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (5): 1654–9. PMID: 16478821.
 9. Hernandez M, Mollo A, Marsal JR, Esquerda A, Capel I, Puig-Domingo M, et al. Insulin secretion in patients with latent autoimmune diabetes (LADA): half way between type 1 and type 2 diabetes: action LADA 9. *BMC Endocr Disord.* 2015; 15: 1. PMID: 25572256; PMCID: PMC4297398.
 10. American Diabetes Association Professional Practice Committee; 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes — 2022. *Diabetes Care.* 2022; 45 (Supplement 1): S17–S38.
 11. Akil AA, Yassin E, Al-Maraghi A, Aliyev E, Al-Malki K, Fakhro KA. Diagnosis and treatment of type 1 diabetes at the dawn of the personalized medicine era. *J Transl Med.* 2021; 19 (1): 137. PMID: 33794915; PMCID: PMC8017850.
 12. Timakova AA, Saltykov BB. Osobennosti razvitiya latentnogo diabeta vzroslyh (LADA). *Arxiv patologii.* 2019; 81 (4): 78–82. Russian.
 13. Hernández M, Nóvoa-Medina Y, Faner R, Palou E, Esquerda A, Castelblanco E, et al. Genetics: Is LADA just late onset type 1 diabetes? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022; 13: 916698. PMID: 36034444; PMCID: PMC9404871.
 14. Said G, Goulon-Goeau C, Slama G, Tchobroutsky G. Severe early-onset polyneuropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. A clinical and pathological study. *N Engl J Med.* 1992; 326 (19): 1257–63. PMID: 1560802.
 15. Shafi OM, Latief M. Early onset symptomatic neuropathy in a child with Type 1 Diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* 2017; 11 (Suppl 1): S477–S479.

РОЛЬ КАВКАЗСКОГО, ИРАНСКОГО И СТЕПНОГО НАСЕЛЕНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ МНОГООБРАЗИЯ АУТОСОМНОГО ГЕНОФОНДА ВОСТОЧНОГО КАВКАЗА

Е. В. Балановская^{1,2}, И. О. Горин¹, В. С. Петрушенко¹, Г. Ю. Пономарёв¹, Р. О. Белов¹, Э. А. Почешхова^{1,3}, В. А. Салаев¹, Н. А. Искандаров¹, В. Ю. Пылёв^{1,2} ✉

¹ Медико-генетический научный центр, Москва, Россия

² Биобанк Северной Евразии, Москва, Россия

³ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

На Восточном Кавказе проживают более 30 народов, говорящих на кавказских, иранских и тюркских языках. Слияние многих миграционных потоков и сложная популяционная структура Восточного Кавказа затрудняют анализ его генофонда: из всех регионов Кавказа он наименее изучен. Цель работы — выявить основные закономерности в изменчивости аутосомных генофондов этого региона. По обширным панелям SNP-маркеров изучено 356 геномов 29 этносов: 243 генома 22 народов Восточного Кавказа и 113 геномов 7 народов окружающих регионов. Биоинформатический анализ проведен методами предковых компонент ADMIXTURE и главных компонент изменчивости генофонда (PCA). Выдвинута гипотеза трех основных пластов генофонда Восточного Кавказа, взаимодействие которых формирует его структуру. «Дагестанский» пласт несет информацию о генофонде древнего автохтонного населения Северного Кавказа. «Иранский» пласт отражает наследие древних и средневековых волн миграций ираноязычного населения: он составляет три четверти генофонда современного Азербайджана и около трети генофонда народов Дагестана. «Степной» пласт фиксирует слабое влияние евразийской степи. Взаимодействие трех генетических пластов лишь косвенно связано с языковой принадлежностью народов, но у кавказоязычных народов связь с лингвистикой проявляется ярче. Выявлены четыре генетически своеобразные группы коренного населения Восточного Кавказа, комплекс которых должен включаться в характеристику его аутосомного генофонда: 1) даргинцы, лакцы; 2) аварцы, лезгины, табасараны, агулы, рутульцы, цахуры; 3) кумыки, таты и азербайджанцы Дагестана; 4) азербайджанцы и талыши Азербайджана. Определены направления дальнейших исследований.

Ключевые слова: геногеография, генофонд, популяционная генетика, аутосомные SNP-маркеры, Восточный Кавказ, народонаселение

Финансирование: исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ №21-74-00156 (биоинформационный анализ генофондов Восточного Кавказа и Закавказья), Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Медико-генетического научного центра им. академика Н. П. Бочкова (картографический анализ, интерпретация результатов), Биобанка Северной Евразии (экспедиционное исследование).

Благодарности: авторы благодарят всех участников экспедиционного обследования (доноров образцов), АНО «Биобанк Северной Евразии» — за предоставление коллекций ДНК и результатов генотипирования.

Вклад авторов: Е. В. Балановская — руководство, дизайн и написание статьи, организация и проведение экспедиционного обследования народов Дагестана; И. О. Горин, В. С. Петрушенко — биоинформатический анализ; Г. Ю. Пономарев — работа с ДНК-коллекциями, картографический анализ; Р. О. Белов — работа с ДНК-коллекциями, оформление статьи; Э. А. Почешхова — проведение экспедиционного обследования народов Дагестана; В. А. Салаев — организация и проведение обследования талышей Азербайджана; Н. А. Искандаров — организация и проведение обследования азербайджанцев Азербайджана; В. Ю. Пылёв — организация генотипирования, статистический анализ.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медико-генетического научного центра имени Н. П. Бочкова (протокол № 1 от 29 июня 2020 г.).

✉ Для корреспонденции: Владимир Юрьевич Пылёв

ул. Москворечье, д. 1, 115522, г. Москва, Россия; freetrust@yandex.ru

Статья получена: 26.04.2023 Статья принята к печати: 13.05.2023 Опубликовано онлайн: 29.05.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.017

THE ROLE OF CAUCASIAN, IRANIAN AND STEPPE POPULATIONS IN SHAPING THE DIVERSITY OF AUTOSOMAL GENE POOL OF THE EASTERN CAUCASUS

Balanovska EV^{1,2}, Gorin IO¹, Petruschenko VS¹, Ponomarev GYu¹, Belov RO¹, Pocheshkhova EA^{1,3}, Salaev VA¹, Iskandarov NA¹, Pylev VYu^{1,2} ✉

¹ Bochkov Research Centre of Medical Genetics, Moscow, Russia

² Biobank of North Eurasia, Moscow, Russia

³ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Eastern Caucasus is home to more than 30 peoples speaking Caucasian, Iranian and Turkic languages. Fusion of multiple migration flows together with the complex population structure of the Eastern Caucasus make it more difficult to analyze its gene pool: this is the most poorly studied one among all regions of the Caucasus. The study is aimed to identify the main patterns of the autosomal gene pool variation in this region. A total of 356 genomes of 29 ethnic groups were studied using the large panels of SNP markers: 243 genomes of 22 peoples of the Eastern Caucasus and 113 genomes of 7 peoples living in adjacent regions. The bioinformatics analysis involved the use of the ADMIXTURE ancestral component method and the gene pool variability principal component analysis (PCA). The hypothesis of three genetic strata, the interaction of which forms the structure of gene pool of the Eastern Caucasus, was put forward. The “Dagestan” stratum carries information about the gene pool of the ancient autochthonous population of the Eastern Caucasus. The “Iranian” stratum represents the legacy of ancient and middle-aged migrations surges of the Iranian-speaking population: it constitutes three quarters of the gene pool of modern Azerbaijan and about one third of the Dagestan peoples’ gene pool. The “Steppe” stratum represents a negligible influence of the Eurasian steppe. Interaction of three genetic strata is only indirectly related to the peoples’ linguistic affiliation, however, the association with linguistics is more obvious in the Caucasian-speaking peoples. Four genetically distinct groups of indigenous population of the Eastern Caucasus have been identified, the combination of which should be included in the characteristics of its autosomal gene pool: 1) Dargins, Laks; 2) Avars, Lezghins, Tabasarans, Aghuls, Rutul people, Tsakhur people; 3) Kumyks, Tat people and Azerbaijanis living in Dagestan; 4) Azerbaijanis and Talysh living in Azerbaijan. The directions of further research have been defined.

Keywords: gene geography, gene pool, population genetics, autosomal SNP markers, Eastern Caucasus, population

Funding: the study was supported by the RSF grant № 21-74-00156 (bioinformatics analysis of gene pools of the Eastern Caucasus and Transcaucasia), State Assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation for the Research Centre of Medical Genetics (cartographic analysis, data interpretation), Biobank of North Eurasia (expedition survey).

Acknowledgements: the authors would like to thank all members of the expedition survey (sample donors) and the autonomous non-profit organization “Biobank of North Eurasia” for access to DNA collections and the genotyping results.

Author contribution: Balanovska EV — management, design, manuscript writing and expedition survey of the Dagestani peoples; Gorin IO, Petruschenko VS — bioinformatics analysis; Ponomarev GYu — work with DNA collections, cartographic analysis; Belov RO — work with DNA collections, manuscript formatting; Pocheshkhova EA — expedition survey of the Dagestani peoples; Salaev VA — organization and conducting the expedition survey of the Talysh living in Azerbaijan; Iskandarov NA — organization and conducting the expedition survey of the Azerbaijanis living in Azerbaijan; Pylev VYu — organization of genotyping, statistical analysis.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Bochkov Research Centre of Medical Genetics (protocol № 1 of 29 June 2020).

✉ Correspondence should be addressed: Vladimir Yu. Pylev

Moskvorechye, 1, 115522, Moscow, Russia; freetrust@yandex.ru

Received: 26.04.2023 Accepted: 13.05.2023 Published online: 29.05.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.017

Генофонд народов Кавказа давно привлекает внимание популяционных генетиков. Этот небольшой по площади регион, расположенный между Европой и Азией, населяет более 60 народов, говорящих на языках трех лингвистических семей — кавказской, индоевропейской и алтайской. Из всех регионов Кавказа наименее генетически изучен Восточный Кавказ, где сосредоточен самый обширный спектр (более 30) народов, представляющих три лингвистические семьи. Поскольку западный Прикаспий в течение тысячелетий служил мостом между Европой и Азией, для понимания генофонда Восточного Кавказа надо привлекать данные и о степях на севере региона, и популяциях Иранского горного плато. Причудливая структура народов Восточного Кавказа и сплетение множества миграционных потоков крайне осложняют анализ его генофонда. Если по генетике популяций Дагестана имеется ряд публикаций, то население Азербайджана представляет одно из самых больших белых пятен на генетической карте. А ведь именно оно является ключевым для выявления многовекового влияния Персии на генофонды Восточного Кавказа: распространялось оно на весь Каспийский регион или концентрировалось только на южных приграничных генофондах? Генетическая история ряда малочисленных на Северном Кавказе народов тоже может быть реконструирована только при планомерном генетическом изучении Восточного Кавказа в контексте данных о народах Ирана.

Сложная структура полиэтничного региона Восточного Кавказа требует детального анализа. Поэтому в данной работе внимание сосредоточено только на его аутосомном генофонде. Параллельно будет опубликована статья по изменчивости Y-хромосомы в этих же популяциях Восточного Кавказа. Такое «бинокулярное зрение» позволит увидеть наиболее объемную и объективную картину изменчивости генофонда Восточного Кавказа.

По широкогеномным панелям — одной из наиболее востребованных за последние 10 лет и эффективных систем ДНК-маркеров — опубликовано крайне мало данных о популяциях Дагестана и Азербайджана. Почти во всех этих статьях данные по Восточному Кавказу не анализировали отдельно, они были лишь составной частью изучения много более обширных регионов — всего Кавказа или Евразии.

Популяции Дагестана изучены по панели Illumina (~600 тыс. SNP) в работе [1] о генофонде Кавказа в целом и по панели Human Origin (~600 тыс. SNP) [2].

Генофонд азербайджанцев Северо-Западного Ирана рассмотрен в работе о следах тюркской экспансии [3], где для них показан 5%-й вклад восточноевразийской предковой компоненты, что можно объяснить распространением тюркских языков на запад согласно модели «доминирования элиты» (смена языка без значительного изменения генофонда). Азербайджанцы Азербайджана по широкогеномной панели Human Origin представлены только в статье [2] при сравнении с другими генофондами.

В большинстве публикаций рассмотрен широкий круг проблем: формирование генофонда Кавказа на основе вклада ближне- и средневожочных миграций [1], наследие миграции тюркоязычных групп [3] или эко-географического районирования Северной Евразии [2]. При этом особенности генофонда Восточного Кавказа прицельно не анализируются. Отдельные немногочисленные выборки народов Восточного Кавказа представлены и в двух других крупных исследованиях,

посвященных совсем иным вопросам [4, 5]. К сожалению, часть из упомянутых выборок проанализирована только по панели HumanOrigin (Affimatrix), плохо сопоставимой с панелью Illumina.

Из исследований последних лет стоит отметить полногеномные и полноэкзомные исследования генофондов Ирана и Турции. Авторы одной из работ [6] изучают геномную изменчивость народов Ирана. Поскольку исследование нацелено на составление базы данных геномного разнообразия Ирана, то в нем уделено много внимания генетической структуре самого Ирана, а соседние регионы (в частности Азербайджан) затронуты лишь поверхностно. Похожая ситуация и в работе [7], где анализируется генетическая структура популяций Турции, однако влияние Восточного Кавказа описывается только кратким упоминанием об их смешении с некоторыми популяциями Турции.

В целом по народам Восточного Кавказа в опубликованных данных приведены генотипы только 43 образцов, изученных в основном по узким панелям Illumina, тогда как в рамках данной работы проанализировано 243 образца по широкой панели Illumina.

Таким образом, в мировой литературе по широкогеномным панелям не только отсутствуют выводы по генофонду Восточного Кавказа, но и сами данные крайне немногочисленны и охватывают лишь отдельные группы — тогда как в данной работе представлены популяции 22 народов Восточного Кавказа.

В работе, посвященной поиску аланского следа в аутосомных генофондах Северного Кавказа [8], основное внимание уделено этносам Центрального и Западного Кавказа. Генофонд народов Восточного Кавказа был представлен четырьмя народами Дагестана. Полученный результат указал на необходимость как детального рассмотрения этих данных о генофонде Восточного Кавказа, так и прицельного анализа аутосомных генофондов всей совокупности народов этого региона и выявления основных закономерностей в его изменчивости, что стало целью предполагаемого исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной работе в понятие «народы Восточного Кавказа» включено все коренное население Дагестана (17 этносов), Азербайджана (азербайджанцы, азербайджанцы-карапапахы, талыши), а также другие ираноязычные народы (курды и езиды), изученные на Кавказе (они включают мигрантов из разных популяций Кавказа и Ирана; в данной работе рассмотрены как представители ираноязычного населения Восточного Кавказа, который входит в их этнический ареал). Эти 22 этнические группы Восточного Кавказа представлены (табл. 1) собственными данными коллектива о 243 геномах. По единой панели SNP-маркеров они проанализированы в контексте собственных данных о соседних народах Центрального Кавказа (чеченцы) и Закавказья (грузины), Прикаспия (астраханские ногайцы) и Закаспия (каракалпаки, туркмены) и литературных данных о народах Ирана [3, 9].

Общая анализируемая выборка составила 356 геномов 29 этносов: собственные данные (318 геномов 27 этносов) изучены по панелям Illumina4M и Illumina750K; литературные данные (38 геномов 2 этносов) — по панелям Illumina750K и HumanOrigin. Проведена фильтрация с помощью PLINK 1.9 [10]: по качеству прочтения геномов; родственности индивидов (менее 3-й степени по версии

программы KING 2.3.0 [11]); сцепленности ДНК-маркеров и их мономорфизму.

Анализ главных компонент изменчивости геномов (PCA) проведен с помощью утилиты smartpca из пакета EIGENSTRAT [12]. Конвертация формата plink (bed-bim-fam) в формат eigensoft (eigenstratgeno-snp-ind) осуществлена с помощью программы convertf из того же программного пакета (с параметрами по умолчанию). Расчет проведен для пяти главных компонент с пятью итерациями исключения outliers, результаты визуализированы на языке программирования Python 3 с использованием библиотек pandas [13], matplotlib [14] и seaborn [15]. Для каждой популяции на графике главных компонент определен (и обозначен более крупной точкой) ее центроид как средняя по всем рассчитанным компонентам и по всем образцам, входящим в эту популяцию.

Анализ предковых компонент методом ADMIXTURE проводили с помощью программного обеспечения ADMIXTURE v1.3.0 [16], значение количества моделируемых предковых компонент K варьировалось от 2 до 20. Для

каждого значения K была рассчитана кросс-валидация для его вероятностной оценки. Визуализацию результатов работы ADMIXTURE осуществляли на Python 3 с помощью библиотек pandas, matplotlib, seaborn.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предварительная оценка вклада предковых компонент ADMIXTURE в генофонды четырех народов Дагестана

В более ранней публикации [8] аутосомный генофонд Восточного Кавказа был представлен геномами Дагестана — кавказоязычных (даргинцы, лакцы, табарасаны) и ираноязычных (таты) народов. В модели предковых компонент (ПК) ADMIXTURE при $K = 11$ вклад дагестанской ПК в эти геномы составил 77%. Однако остается вопрос: насколько правомерно такое объединение? Геномы каких многочисленных народов Восточного Кавказа могут корректно представлять его при изучении крупных регионов Евразии?

Таблица 1. Лингвистическая принадлежность и численность изученных геномов

ЛИНГВИСТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ				Народы	N геномов	
Семья	Ветвь	Субветвь	Группа			
Кавказская	Нахско-дагестанская	Лезгино-дарго-лакская	Даргинская	кубачинцы	6	
				даргинцы	8	
				кайтагцы	8	
			Лакская	лакцы	11	
				Лезгинская	табарасаны	11
					агулы	1
		рутульцы	9			
		цахуры	8			
		Аваро-андо-цезская	лезгины	43		
			Аварская	аварцы	7	
			Андийская	тиндинцы	6	
		Цезская (дидойская)	дидойцы	5		
гинухцы	5					
Нахская	чеченцы	15				
Картвельская	Южно-картвельская	грузины	19			
Алтайская	Тюркская	Половецко-кыпчакская	Кавказская	кумыки	27	
		Огузская	Собственно огузская	азербайджанцы:		
				Дагестана,	9	
				Азербайджана,	13	
				Ирана*	18	
				карапахахи	6	
		туркмены	19			
		Кыпчакская	Кыпчакско-ногайская	караногайцы,	11	
				ногайцы астраханские,	5	
				каракалпаки	17	
Индо-европейская	Арийская	Ново-иранская	Юго-западная	таты Дагестана	13	
				ираноязычные народы Ирана**	20	
		Северо-западная	талыши	10		
			езиды	10		
			курды	16		

Примечание: литературные данные по народам Ирана [3, 9].

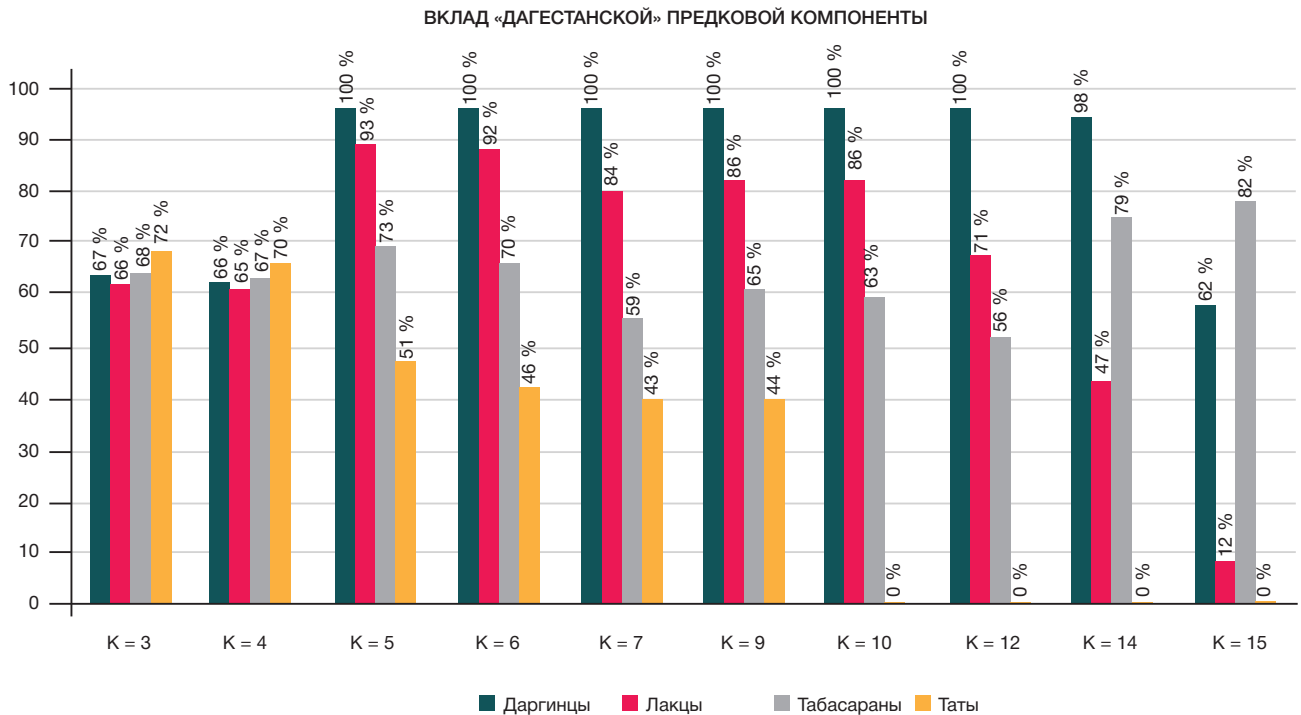


Рис. 1. Динамика вклада «дагестанской» предковой компоненты ADMIXTURE в геномы каждого из даргинцев, лакцев, табасаран и татов в моделях от $K = 3$ до $K = 15$

Динамика вклада «дагестанской» компоненты по мере увеличения числа ПК (рис. 1) выявляет различия между этносами уже при малом числе ПК ($K = 5$). С $K = 10$ таты Дагестана формируют свою собственную ПК, отделяясь от кавказоязычных народов. При этом (рис. 1) вклад генофонда Дагестана в основном делают даргинцы: в их геномы вклад «дагестанской» ПК в интервале $4 < K < 15$ составляет 98–100% и лишь при $K = 15$ падает до 62%. Иную динамику можно наблюдать для лакцев: при увеличении значения K от 5 до 15 вклад в их геномы «дагестанской» ПК падает от 93 до 29% по мере проявления собственной ПК лакцев. У табасаран своеобразный паттерн: при увеличении числа ПК от $K = 5$ до $K = 12$ вклад в их геномы «дагестанской» ПК падает от 73 до 56%, но затем возрастает до 82% при $K = 15$.

Это сравнение позволило обнаружить неожиданный феномен: при разном числе ПК ($3 < K < 15$) «дагестанская» отражает генофонды разных этносов Дагестана. Только при малом числе ПК ($K = 3$ и $K = 4$) их вклад одинаков, но при $K > 4$ постепенно исчезает вклад татов и лакцев, а вклад даргинцев и табасаран меняется по величине. Такой результат говорит о необходимости создать генетические портреты аутосомных генофондов для каждого из народов Восточного Кавказа, а затем сформировать группы этносов, которые могут служить опорными при анализе аутосомных генофондов Кавказа и других крупных регионов Евразии.

Положение 22 народов Восточного Кавказа в пространстве главных компонент

Для корректного ответа на поставленные вопросы важно, во-первых, охватить исследованием максимально возможный спектр народов Восточного Кавказа, а во-вторых — использовать основные независимые методы анализа популяционной генетики.

На рис. 2 приведено положение 22 народов Восточного Кавказа и шести групп сравнения в генетическом

пространстве 1 и 2 главных компонент (ГК) изменчивости генофонда. Четко выявляются шесть кластеров геномов, которые показывают, что сходство аутосомных геномов народов Восточного Кавказа очень слабо соответствует классификации их языков. Почти все кластеры включают народы, говорящие не только на разных ветвях языков, но даже на языках разных лингвистических семей (табл. 2). Первая ГК четко делит все народы на степные и все остальные. Зато вторая ГК демонстрирует длинную цепь — от кубачинцев до курдов — всех остальных геномов (рис. 2).

Дарго-лакско-андо-цезский кластер включил представителей пяти этносов четырех групп разных субветвей нахско-дагестанских языков (табл. 2): даргинцев, кайтагцев, кубачинцев, лакцев, тиндинцев, дидойцев, гинухцев. Отметим, что по другим ГК от всего массива резко отличаются геномы изолированных популяций: дидойцы, гинухцы по третьей 3 ГК, одноаульный этнос кубачинцев по 4 ГК, тиндинцы по 5 ГК.

Лезгино-аварский кластер включил представителей шести этносов из обеих субветвей нахско-дагестанских языков (табл. 2). Из аварской группы в кластер вошли лишь аварцы. Но хотя их центроид и расположен среди геномов лезгинских народов, отдельные геномы аварцев крайне разнообразны (рис. 2; красные точки): они тянутся вдоль всего лезгино-аварского кластера и уходят за его пределы к андо-цезам. Для лезгинских народов мы не видим различий между геномами восточно-лезгинской (лезгины, табасараны, агулы) и рутульско-цахурской (рутульцы, цахуры) подгрупп. При этом геномы самих лезгин (фиолетовые точки на рис. 2) тянутся в другой кластер — к татам и азербайджанцам Дагестана.

Тюрко-иранский кластер Дагестана объединил геномы ираноязычных татов и тюркоязычных кумыков и азербайджанцев Дагестана (табл. 2). Сходство геномов татов и азербайджанцев Дагестана не удивляет, поскольку татов в Дагестане было принято записывать как «азербайджанцев», и разделение проведено по местам их компактного проживания в Дагестане. Геномы всех трех

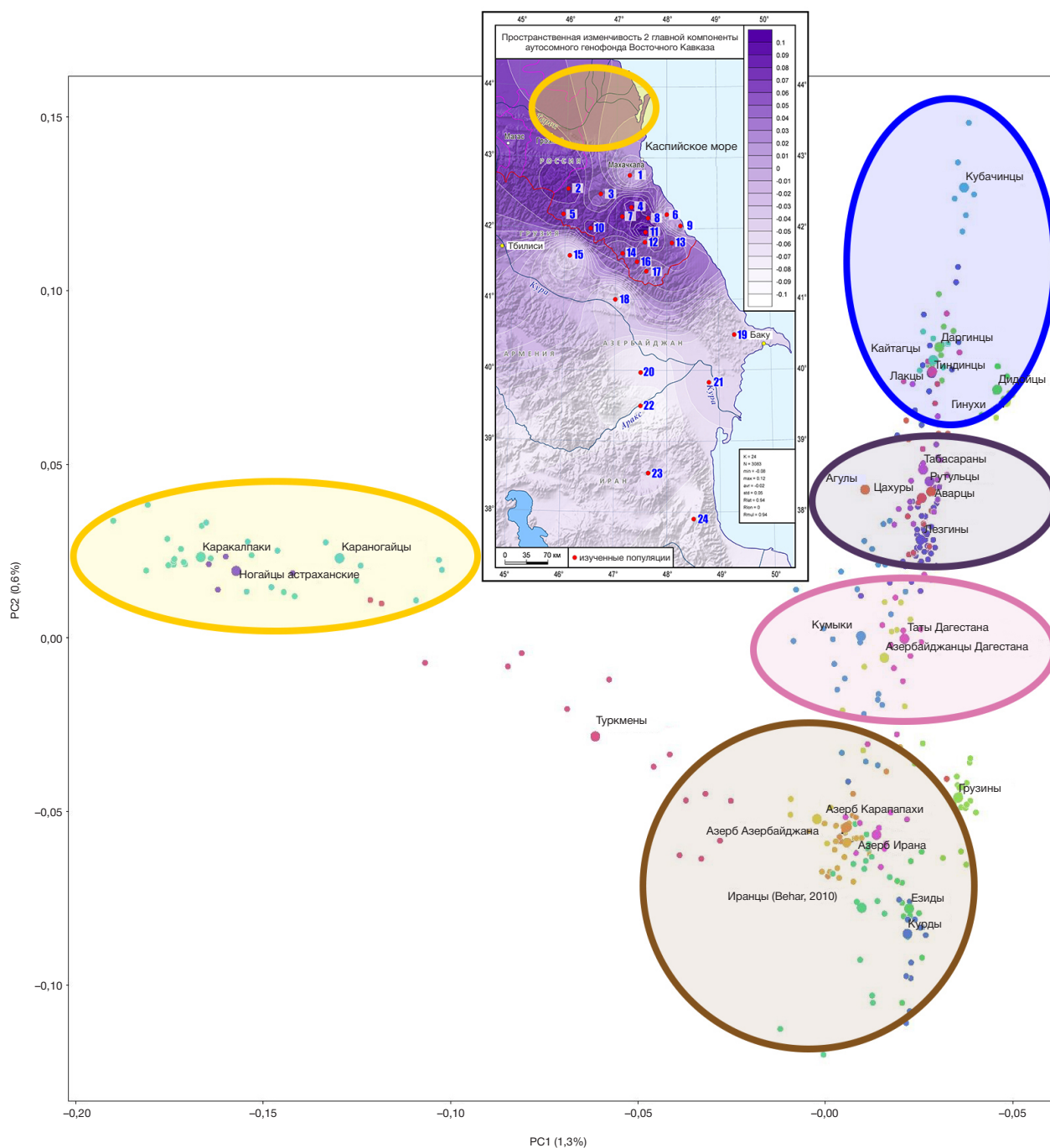


Рис. 2. График 1–2 главных компонент изменчивости (PCA) геномов коренного населения Восточного Кавказа в контексте окружающих популяций. На врезке приведена карта 2-й главной компоненты. 1 — кумыки; 2 — тиндинцы; 3 — аварцы; 4 — даргинцы; 5 — гинухцы; 6 — азербайджанцы Дагестана; 7 — лакцы; 8 — кайтагцы; 9 — таты Дагестана; 10 — дидойцы; 11 — кубачинцы; 12 — агулы; 13 — табасараны; 14 — цахуры; 15 — грузины; 16 — рутульцы; 17 — лезгинцы; 18 — азербайджанцы-карапахахи; 19 — азербайджанцы Азербайджана; 20 — езиды; 21 — талыши; 22 — курды; 23 — азербайджанцы Ирана [3]; 24 — ираноязычные иранцы [9]

этносов весьма многолики и тяготеют к азербайджано-иранскому кластеру. Но разнообразие геномов кумыков (рис 2; синие точки) зашкаливает — они тоже входят и лезгино-аварский кластер.

Азербайджано-иранский кластер Дагестана вновь объединил геномы тюрков (азербайджанцев Азербайджана и Ирана) с ираноязычными народами (талыши, курды, езиды и суммарная группа Ирана). По 1 ГК только одна группа азербайджанцев — карапахахи — обнаруживает небольшой сдвиг к народам Евразийской степи. Зато геномы туркмен (рис. 2; розовые точки) обозначили целый мост между азербайджано-иранским и степным кластерами. Другой «полюс» азербайджано-иранского

кластера фиксируют грузинские геномы, которые в других вариантах ГК сближаются с народами Северного Кавказа.

Степной кластер объединил караногайцев Дагестана с другими степными народами Прикаспийской степи (астраханские ногайцы) и Закаспия (каракалпаки). Резкое отличие геномов степного кластера формирует различия по 1 ГК, отражающей наибольшую изменчивость анализируемых геномов.

Пространственная изменчивость главных компонент

На карте 2 ГК (рис. 2; врезка) на севере Дагестана мы разместили в ареале караногайцев желтый овал,

Таблица 2. Кластеры в генетическом пространстве 1–2 главных компонент (PCA) и этнолингвистическая принадлежность геномов каждого кластера

Кластер	ЛИНГВИСТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ				Народы
	Семья	Ветвь	Субветвь	Группа	
Дарго-лакско-андо-цезский	Кавказская	Нахско-дагестанская	Лезгино-дарго-лакская	Даргинская	кубачинцы, даргинцы
				Лакская	кайтагцы
			Аваро-андо-цезская	Андийская	лакцы
				Цезская (дидойская)	тиндинцы
					дидойцы
Лезгино-аварский	Кавказская	Нахско-дагестанская	Лезгино-дарго-лакская	Лезгинская	табасараны
					агулы
					рутульцы
					цахуры
			Аваро-андо-цезская	Аварская	лезгины
Тюрко-иранский Дагестана	Алтайская	Тюркская	Половецко-кыпчакская	Кавказская	кумыки
			Огузская	Собственно огузская	азербайджанцы Дагестана
	Индо-европейская	Арийская	Ново-иранская	Юго-западная	таты Дагестана
Азербайджано-иранский	Алтайская	Тюркская	Огузская	Собственно огузская	азербайджанцы Азербайджана
					азербайджанцы Ирана
					карапапахы
	Индо-европейская	Арийская	Ново-иранская	Северо-западная	талыши
					езиды
Юго-западная	ираноязычные народы Ирана**				
Степной тюркский	Алтайская	Тюркская	Кыпчакская	Кыпчакско-ногайская	караногайцы, ногайцы астраханские
					каракалпаки
Отдельно	Алтайская	Тюркская	Огузская	Собственно огузская	туркмены
Отдельно	Кавказская	Картвельская	Южно-картвельская		грузины

указывающий на влияние евразийской степи по 1 ГК. Карта позволяет увидеть взаимодействие трех генетических пластов в ареале Восточного Кавказа. С юга распространяется влияние Ирана, захватывающее весь Азербайджан и пробирающееся в Дагестан по кромке Каспийского моря. Дагестан сохраняет генетическое своеобразие автохтонного населения восточной окраины Северного Кавказа. С севера распространяется наиболее позднее влияние евразийской степи. И эти три генетических пласта слабо связаны с тремя крупными лингвистическими подразделениями — ираноязычных, кавказоязычных и тюркоязычных народов. Для проверки гипотезы «трех пластов» далее был использован независимый метод биоинформатики.

Вклад предковых компонент ADMIXTURE в генофонды народов Восточного Кавказа

Рассмотрев положение геномов Восточного Кавказа в пространстве главных компонент изменчивости, перейдем к анализу более информативного метода — к моделированию предковых компонент методом ADMIXTURE. Напомним, что каждая модель рассчитана по совокупности всех тех же геномов, что и в предыдущем анализе (дополнены лишь чеченцами, которые в анализе

ГК ушли в аутлайеры), и каждая модель отличается лишь тем, какое число предковых компонент (К) мы задаем для данной модели. Из всех моделей с К от 2 до 20 для детального рассмотрения отобраны три (К = 3, К = 10, К = 20), позволяющие проследить динамику по мере увеличения числа гипотетических предковых популяций (рис. 3).

Модель трех предковых компонент

Вклад в каждый геном каждой из трех предковых компонент (ПК) окрашен своим цветом. И полученная картина ADMIXTURE может служить подтверждением гипотезы «трех пластов» генофонда Восточного Кавказа: рыжий цвет, характерный для караногайцев, отражает гипотетический степной генетический пласт; зеленый цвет, ярко выраженный у курдов и ираноязычных иранцев, — иранский пласт; желтый цвет, преобладающий в геномах народов Дагестана, — вклад кавказоязычного населения региона. Если мы примем такую интерпретацию цветовой гаммы, то можем оценить вклад каждого из трех генетических пластов в геномы народов Восточного Кавказа и проверить гипотезу трех пластов его генофонда. Для этого объединим геномы в соответствии с кластерами (табл. 2) и представим вклады ПК на столбчатой

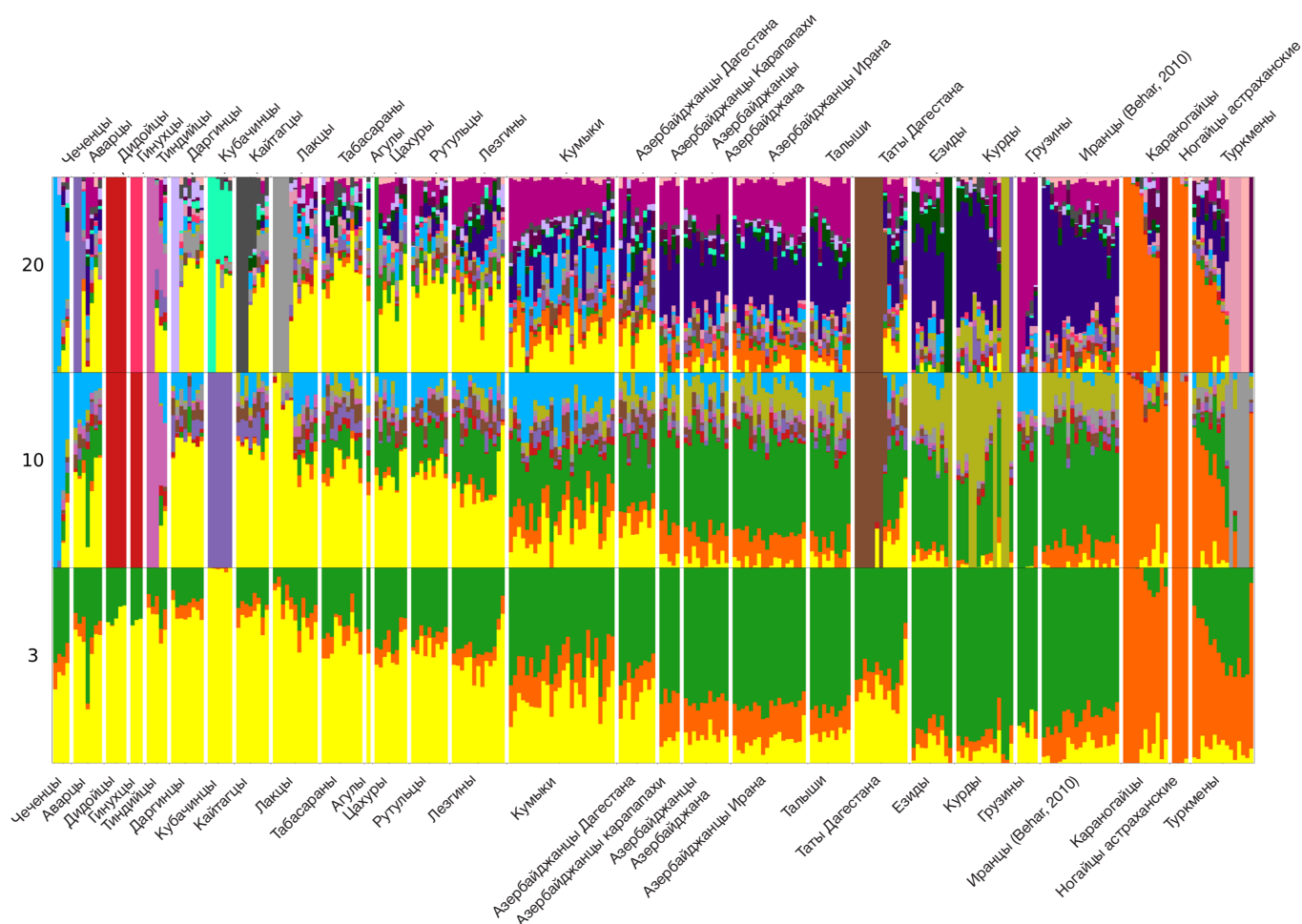


Рис. 3. Вклад предковых компонент ADMIXTURE (в %) в геномы народов Восточного Кавказа при числе предковых компонент $K = 3$, $K = 10$, $K = 20$

диаграмме (рис. 4; количественные оценки см. на рис. А в Приложении).

По соотношению «трех пластов» геномные профили ПК оказались в очень хорошем соответствии с кластерами ГК. «Кавказский» вклад в геномах дарго-лакского кластера составляет 75%; в лезгино-аварском — чуть более половины генофонда; в тюрко-иранском — около трети, в азербайджанско-иранском — около 10%. По мере убывания «кавказского» пласта столь же резко возрастает «иранский»: 17%, 35%, 50%, 75%. «Степной» пласт оказывается мощным только в степном кластере (91%): у кавказоязычных народов он составляет всего 7–8%, а у тюркоязычных — 14–19%.

Модель 10 предковых компонент

При моделировании 10 предковых компонент для той же совокупности геномов мы видим сохранение трех исходных ПК («Степь», «Иран», «Кавказ»). Однако их соотношение несколько меняется за счет появления новых ПК. Те новые компоненты, которые вносят небольшой вклад в геномы других народов (рис. 3), объединены в одну ПК «Прочие» (рис. 4). К ним отнесены ПК малочисленных этносов (кубачинцы, дидойцы, гинухцы, тиндинцы), обычно отражающие близкородственные геномы в их пределах, а также особые варианты ПК у части геномов татов и туркмен.

При таком объединении в модели при $K = 10$ (рис. 4; см. также рис. Б в Приложении) появляются только две новые компоненты, отражающие влияние народов других

регионов Кавказа: одна преобладает у грузин, другая — у чеченцев. ПК «Нахи» забирает на себя в основном вклад от «кавказского» пласта, а ПК «Закавказье» — от «иранского» пласта. Поскольку вклад ПК «Закавказье» в геномы ираноязычного населения Ирана (54%) практически равен ее вкладу в геномы самих грузин (58%), можно предполагать, что ПК «Закавказье» отражает древний переднеазиатский пласт в генофондах Кавказа и Закавказья.

Модель 20 предковых компонент

При моделировании 20 предковых компонент для той же совокупности геномов мы видим — кроме обнаруженных еще при $K = 3$ двух исходных ПК («Степь», «Иран») — четыре новых ПК, которые выделились из ПК «Кавказ» и отражают генетическое своеобразие народов даргинской и лезгинской групп, аварцев и лакцев (рис. 4; см. также рис. В в Приложении). Из них наибольший вклад в геномы других народов Дагестана вносит «Лезгинская» ПК — она описывает треть генофондов дарго-лакского и аварского кластеров, половину лезгинского генофонда и пятую часть генофонда кумыков.

Но крайне важно, что наряду с выделением собственных ПК в геномах всех народов Дагестана сохраняется общий генетический пласт, отраженный желтым тоном на рис. 3 и 4. Раньше мы называли этот пласт «Кавказ». Но поскольку в геномах других кавказских народов преобладают иные ПК, то мы имеем полное право дать этому генетическому пласту более точное название — ПК «Дагестан».

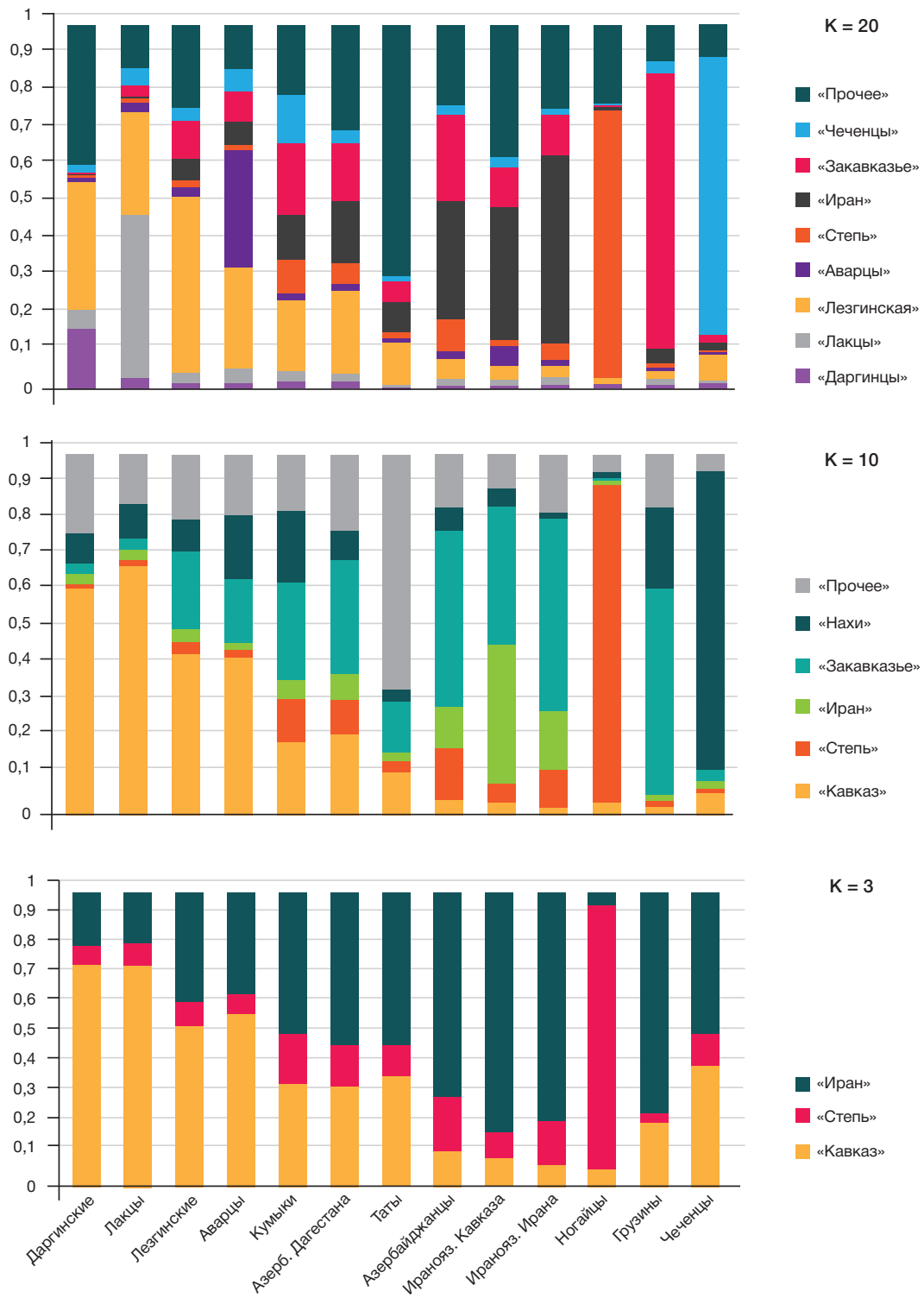


Рис. 4. Относительный вклад предковых компонент ADMIXTURE (в %) в геномы народов Восточного Кавказа при $K = 3$, $K = 10$, $K = 20$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Два независимых метода биоинформатического анализа изменчивости геномов народов Восточного Кавказа позволяют выявить схожие закономерности и дополняют друг друга.

Три генетических пласта

Оба метода выявляют наличие трех генетических пластов, один из которых связан с многочисленными волнами

иранского населения, второй — с поздним влиянием евразийской степи, третий — с древним населением, сформировавшимся в ареале современного Дагестана. Мощности этих генетических пластов различна в разных группах населения Восточного Кавказа.

«Степной» генетический пласт на Восточном Кавказе составляет почти весь генофонд лишь у караногайцев, а в остальных геномах региона варьирует в пределах от 7% у народов Дагестана до 19% в Азербайджане. Однако результаты указывают, что этот «степной» пласт составляет основу генофондов многих народов Каспийского региона

(астраханских ногайцев, каракалпаков, туркмен), отражая мощную генетическую составляющую на огромном пространстве.

«Иранский» генетический пласт на Восточном Кавказе играет очень важную роль, пронизывая все генофонды Азербайджана и «тая» по мере движения по Дагестану от его южных пределов (лезгинские народы) и Прикаспия (кумыки, таты) к центру и северу.

«Дагестанский» генетический пласт составляет основу всех народов Дагестана. Хотя практически для всех изученных народов Дагестана при высоких значениях K и выявляется собственная предковая компонента, все этносы Дагестана объединяет мощный общий древний генетический пласт. Это важный вывод из данной работы.

Все три генетических пласта хорошо ложатся на географическое пространство Восточного Кавказа. «Степной» ограничен только небольшим ареалом евразийской степи на севере региона. Зато южный «иранский» пласт мощным потоком затекает с Иранского плато, составляя три четверти генофонда современного Азербайджана и в среднем треть генофонда у народов Дагестана (кроме караногайцев). «Дагестанский» генетический пласт географически расположен между другими пластами, составляя больше половины генофонда кавказоязычных народов (52–100%). А Прикаспий является перепутьем и местом встречи всех трех пластов: у кумыков, азербайджанцев Дагестана и татов половину генофонда составляет «иранский» пласт, треть — «дагестанский» и около 15% «степной».

Генетика и лингвистика

В отличие от географии, связь между генетикой и лингвистикой очень слаба. В основном это обусловлено переходом на тюркские языки народов Восточного Кавказа (кумыков и азербайджанцев), во многом сохранивших при этом «дотюркский» генофонд. Но мы видим явное влияние окружающих народов и на геномы народов, сохранивших свой язык. Так, «дагестанский» генетический пласт у татов Дагестана достигает 38%, тогда как у других ираноязычных народов Восточного Кавказа (курдов, езидов и тальшей) — всего 9%. Мощность «дагестанского» пласта составляет у кавказоязычных народов Дагестана в среднем две трети генофонда (66%), варьируя в зависимости от контактов с другими народами. И народы Восточного Кавказа не одиноки в нарушении связи между генетикой и лингвистикой. Например, у грузин собственная «грузинская» предковая компонента появляется только при $K = 19$, а на всех моделях при $K < 19$ их генофонд в среднем на три четверти формируется «иранским» пластом.

Литература

1. Yunusbayev B, Metspalu M, Järve M, Kutuev I, Rootsi S, Metspalu E, et al. The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations. *Molecular biology and evolution*. 2012; 29 (1): 359–65.
2. Jeong C, Balanovsky O, Lukianova E, Kahbatkyzy N, Flegontov P, Zaporozhchenko V, et al. The genetic history of admixture across inner Eurasia. *Nature ecology & evolution*. 2019; 3 (6): 966–76.
3. Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Valeev A, Litvinov S, Valiev R, et al. The genetic legacy of the expansion of Turkic-speaking nomads across Eurasia. *PLoS Genetics*. 2015; 11 (4): e1005068.
4. Behar DM, Metspalu M, Baran Y, Kopelman NM, Yunusbayev B,

Выбор «модельных» генофондов

Одной из целей работы был поиск таких групп этносов, которые могут надежно представлять Восточный Кавказ в евразийском масштабе. Два независимых метода дружно указывают на необходимость включения четырех таких групп: 1) даргинцы, лакцы; 2) аварцы, лезгины, табасараны, агулы, рутульцы, цахуры; 3) кумыки, таты и азербайджанцы Дагестана; 4) азербайджанцы и талыши Азербайджана. Их комплекс создает корректное представление многообразия Восточного Кавказа. Поскольку «степной» вклад геномов караногайцев в данном случае невелик, их геномы правильнее рассматривать в контексте генофонда Евразийской степи или же ее Каспийского сегмента.

Планирование дальнейших исследований

Данная работа охватывает основной спектр геномов Восточного Кавказа и в целом отражает полифонию его геномов, но может быть рассмотрена лишь как общий абрис архитектоники его многообразия. Результаты указывают, что необходимо специальное и детальное исследование аутосомных генофондов каждой из четырех групп коренного населения: Дагестана, Азербайджана, ираноязычного населения и населения степей шести стран Каспийского региона и Предкавказья.

ВЫВОДЫ

Выдвинута гипотеза трех генетических пластов, взаимодействие которых формируют «единство в многообразии» генофонда Восточного Кавказа. «Иранский» пласт сформирован многочисленными волнами иранского населения в ареале Восточного Кавказа; «степной» пласт связан с поздним и незначительным влиянием евразийской степи, «дагестанский» — отражает генофонд древнего населения Северного Кавказа. При моделировании большого числа предковых компонент у большинства народов Дагестана выявляется собственная предковая компонента, но все этносы Дагестана объединяет мощный общий древний генетический пласт. Взаимодействие этих трех генетических пластов обусловлено географическими особенностями региона и лишь косвенно связано с лингвистикой. Выявлены четыре группы коренного населения Восточного Кавказа, комплекс которых необходимо включать в характеристику его аутосомного генофонда.

5. Gladstein A, et al. No evidence from genome-wide data of a Khazar origin for the Ashkenazi Jews. *Human biology*. 2013; 85 (6): 859–900.
6. Lazaridis I, Patterson N, Mittnik A, Renaud G, Mallick S, Kirsanov K, et al. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature*. 2014; 513 (7518): 409–13.
7. Fattahi Z, Beheshtian M, Mohseni M, Poustchi H, Sellars E, Nezhadi SH, et al. Iranome: A catalog of genomic variations in the Iranian population. *Human mutation*. 2019; 40 (11): 1968–84.
8. Kars ME, Başak AN, Onat OE, Bilguvar K, Choi J, Itan Y, et al. The genetic structure of the Turkish population reveals high levels of variation and admixture. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences. 2021; 118 (36): e2026076118.
8. Балановская Е. В., Агджоян А. Т., Горин И. О., Петрушенко В. С., Пылёв В. Ю., Кулемин Н. А., и др. В поисках аланского следа: генетическая история Северного Кавказа по полногеномным данным об аутосомном генофонде. Вестник Московского университета. Серия 23. Антропология. 2022 (3): 48–62.
 9. Behar DM, Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Rosset S, Parik J, et al. The genome-wide structure of the Jewish people. *Nature*. 2010; 466 (7303): 238–42.
 10. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 2015; 4: 1–16.
 11. Manichaikul A, Mychaleckyj JC, Rich SS, Daly K, Sale M, Chen WM. Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics*. 2010; 26 (22): 2867–73.
 12. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature genetics*. 2006; 38 (8): 904–9.
 13. McKinney W. Data structures for statistical computing in python. In *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*. 2010; 28–445 (1): 51–56.
 14. Hunter JD. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in science & engineering*. 2007; 9 (03): 90–5.
 15. Waskom M, Botvinnik O, O'Kane D, Hobson P, Lukauskas S, Gempertline DC, et al. *Mwaskom/Seaborn: V0. 8.1*. Zenodo. 2017.
 16. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome research*. 2009; 19 (9): 1655–64.

References

1. Yunusbayev B, Metspalu M, Järve M, Kutuev I, Rootsi S, Metspalu E, et al. The Caucasus as an asymmetric semipermeable barrier to ancient human migrations. *Molecular biology and evolution*. 2012; 29 (1): 359–65.
2. Jeong C, Balanovsky O, Lukianova E, Kahbatkyzy N, Flegontov P, Zaporozhchenko V, et al. The genetic history of admixture across inner Eurasia. *Nature ecology & evolution*. 2019; 3 (6): 966–76.
3. Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Valeev A, Litvinov S, Valiev R, et al. The genetic legacy of the expansion of Turkic-speaking nomads across Eurasia. *PLoS Genetics*. 2015; 11 (4): e1005068.
4. Behar DM, Metspalu M, Baran Y, Kopelman NM, Yunusbayev B, Gladstein A, et al. No evidence from genome-wide data of a Khazar origin for the Ashkenazi Jews. *Human biology*. 2013; 85 (6): 859–900.
5. Lazaridis I, Patterson N, Mitnik A, Renaud G, Mallick S, Kirsanow K, et al. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature*. 2014; 513 (7518): 409–13.
6. Fattahi Z, Beheshtian M, Mohseni M, Poustchi H, Sellars E, Nezhadi SH, et al. Iranome: A catalog of genomic variations in the Iranian population. *Human mutation*. 2019; 40 (11): 1968–84.
7. Kars ME, Başak AN, Onat OE, Bilguvar K, Choi J, Itan Y, et al. The genetic structure of the Turkish population reveals high levels of variation and admixture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021; 118 (36): e2026076118.
8. Balanovska EV, Agdzhojan AT, Gorin IO, Petrusenko VS, Pylev VY, Kulemin NA, i dr. V poiskax alanskogo sleda: geneticheskaya istoriya Severnogo Kavkaza po polnogenomnym dannym ob autosomnom genofonde. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 23. Antropologiya*. 2022 (3): 4–62. Russian.
9. Behar DM, Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Rosset S, Parik J, et al. The genome-wide structure of the Jewish people. *Nature*. 2010; 466 (7303): 238–42.
10. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 2015; 4: 1–16.
11. Manichaikul A, Mychaleckyj JC, Rich SS, Daly K, Sale M, Chen WM. Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics*. 2010; 26 (22): 2867–73.
12. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature genetics*. 2006; 38 (8): 904–9.
13. McKinney W. Data structures for statistical computing in python. In *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*. 2010; 28–445 (1): 51–56.
14. Hunter JD. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in science & engineering*. 2007; 9 (03): 90–5.
15. Waskom M, Botvinnik O, O'Kane D, Hobson P, Lukauskas S, Gempertline DC, et al. *Mwaskom/Seaborn: V0. 8.1*. Zenodo. 2017.
16. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome research*. 2009; 19 (9): 1655–64.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ПОЛНОРАЗМЕРНОЙ И МУЛЬТИЭПИТОПНОЙ мРНК-ВАКЦИН ПРОТИВ *M. TUBERCULOSIS* ПО ВЫРАЖЕННОСТИ Т-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ

О. О. Васильева¹, В. П. Терещенко¹, Б. Н. Крапивин¹, А. Р. Муслимов^{1,2}, И. С. Кукушкин¹, И. И. Патеев¹, С. А. Рыбцов¹, Р. А. Иванов¹, В. В. Решетников^{1,3}✉

¹ Научный центр трансляционной медицины, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус», Сириус, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

Разработка новых вакцин против туберкулеза, эффективных в том числе и у взрослых, является актуальной задачей, поскольку ежегодная смертность от этого заболевания во всем мире превышает 1,5 млн случаев. Несмотря на множество исследований в последние десятилетия, эффективной вакцины все еще не получено. Сопrotивляемость туберкулезу состоит из многих факторов, в этом исследовании сделан акцент на Т-клеточном ответе — механизме, позволяющем элиминировать внутриклеточные патогены, такие как *M. tuberculosis*. Целью исследования было разработать мРНК-вакцину, способную формировать выраженный Т-клеточный ответ на антигены *M. tuberculosis*. С помощью анализа *in silico* были выбраны эпитопы секреторного белка ESAT6 (Rv3875) *M. tuberculosis* для дизайна мультиэпитопной мРНК-вакцины. Проведена оценка эффективности Т-клеточного ответа у мышей, иммунизированных мРНК-вакцинами, которые кодируют полноразмерный или мультиэпитопный антиген. Результаты показали, что при иммунизации мультиэпитопной мРНК-вакциной количество ИFN γ -секретирующих спленоцитов в ответ на специфичную стимуляцию в два раза выше, в сравнении с количеством ИFN γ -секретирующих клеток у мышей, иммунизированных мРНК-вакциной, кодирующей полноразмерный белок. Таким образом, разработанная мультиэпитопная мРНК-вакцина может стать эффективным препаратом для профилактики *M. tuberculosis* посредством формирования выраженного Т-клеточного ответа.

Ключевые слова: мРНК-вакцина, мультиэпитопная вакцина, Т-клеточный ответ, ELISpot

Финансирование: исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-10-2021-113, уникальный идентификатор проекта РФ----193021X0001).

Благодарности: авторы выражают благодарность сотрудникам АНО ВО «Университет «Сириус»: И. М. Теренину за постановку транскрипции *in vitro*, О. В. Заборовой за формуляцию мРНК в липидные наночастицы, М. А. Гавриляк и Е. В. Головину за очистку и характеристику белка Rv3875; Д. В. Шевыреву за постановку эксперимента по внутриклеточному окрашиванию и В. А. Ситиковой за помощь в проведении эксперимента с животными.

Вклад авторов: О. О. Васильева, В. П. Терещенко — клеточные работы, анализ данных, написание статьи, подготовка рисунков; Б. Н. Крапивин, И. И. Патеев, С. А. Рыбцов — клеточные работы, проведение эксперимента с животными, анализ данных; А. Р. Муслимов, И. С. Кукушкин — дизайн конструкций, клонирование; Р. А. Иванов, В. В. Решетников — редактирование текста, анализ данных, координация проекта.

Соблюдение этических стандартов: исследование на животных одобрено этическим комитетом ИЦиГ СО РАН (2022 г.); проведено в соответствии с руководством по уходу и использованию лабораторных животных (2010 г.), Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes (2010 г.), «Правилами надлежащей лабораторной практики» (2016 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Василий Владимирович Решетников
Олимпийский пр-кт, д. 1, г. Сочи, 354340, Россия; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Статья получена: 24.04.2023 **Статья принята к печати:** 15.06.2023 **Опубликована онлайн:** 29.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.021

IMMUNOGENICITY OF FULL-LENGTH AND MULTI-EPILOPE mRNA VACCINES FOR *M. TUBERCULOSIS* AS DEMONSTRATED BY THE INTENSITY OF T-CELL RESPONSE: A COMPARATIVE STUDY IN MICE

Vasileva OO¹, Tereschenko VP¹, Krapivin BN¹, Muslimov AR^{1,2}, Kukushkin IS¹, Pateev II¹, Rybtsov SA¹, Ivanov RA¹, Reshetnikov VV^{1,3}✉

¹ Translational Medicine Research Center, Sirius University of Science and Technology (Autonomous Non-Commercial Higher Education Organization), Sirius, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Development of the new tuberculosis vaccines that would be effective in adults is an urgent task: worldwide, the annual death toll of this disease exceeds 1.5 million. In the recent decades, the matter has been addressed in numerous studies, but none has yielded an effective vaccine so far. There are many factors to resistance against tuberculosis; this study focuses on the T-cell response, a mechanism that enables elimination of intracellular pathogens, such as *M. tuberculosis*. We aimed to develop an mRNA vaccine capable of triggering a pronounced T-cell response to the *M. tuberculosis* antigens. The *in silico* analysis allowed us to select epitopes of the *M. tuberculosis* secreted protein ESAT6 (Rv3875) and design a multi-epitope mRNA vaccine thereon. We assessed the intensity of T-cell response in mice immunized with mRNA vaccines that encode a full-length or multi-epitope antigen. The results of this study in mice show that immunization with a multi-epitope mRNA vaccine produces twice as many IFN γ -secreting splenocytes in response to specific stimulation than immunization with an mRNA vaccine encoding the full-length protein. Thus, the developed multi-epitope mRNA vaccine can be an effective *M. tuberculosis* prevention agent the mode of action of which involves formation of a pronounced T-cell response.

Keywords: mRNA vaccine, multi-epitope vaccine, T-cell response, ELISpot

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-10-2021-113, unique project identifier RF----193021X0001).

Acknowledgements: the authors express their gratitude to the staff of the Sirius University: Terenin IM for *in vitro* transcription, Zaborova OV for the formulation of mRNA into lipid nanoparticles, Gavrilyak MA and Golovin EV for purification and characterization of the Rv3875 protein; Shevirev DV for setting up the intracellular staining experiment and Sitikova VA for assistance in the context of the animal experiment.

Author contribution: Vasileva OO, Tereschenko VP — work with the cells, data analysis, article authoring, figures authoring; Krapivin BN, Pateev II, Rybtsov SA — work with the cells, animal experiment, data analysis; Muslimov AR, Kukushkin IS — design of structures, cloning; Ivanov RA, Reshetnikov VV — text editing, data analysis, project coordination.

Compliance with the ethical standards: animal study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Cytology and Genetics (2022); carried out in accordance with the laboratory animals care guidelines (2010), Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (2010), Good Laboratory Practice guidelines (2016).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vasily V. Reshetnikov
Olympiyskiy prospekt, 1, Sochi, 354340, Russia; reshetnikov.vv@talantiuspeh.ru

Received: 24.04.2023 **Accepted:** 15.06.2023 **Published online:** 29.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.021

Ежегодно регистрируется более 10 млн новых случаев заболеваемости туберкулезом и около 1,5 млн смертей. Пандемия COVID-19 тоже внесла свой вклад в распространённость туберкулеза, который развивается на фоне вирусной инфекции — общемировой уровень заболеваемости туберкулезом в 2020 и 2021 гг. повысился на 3–6% по сравнению с предыдущими годами [1]. Несмотря на это, в пандемийные 2020–2021 гг. заболеваемость туберкулезом в РФ снизилась, но в то же время осложнилось его течение. При первом обращении увеличилось количество больных с деструкцией легочной ткани, массивным бактериовыделением и фиброзно-кавернозным туберкулезом [2].

На данный момент единственной одобренной вакциной для профилактики туберкулеза является БЦЖ. БЦЖ используют более 100 лет и помимо туберкулеза она способна обеспечивать неспецифичную защиту против других респираторных и вирусных заболеваний, обеспечивая тренированный иммунитет [3]. В Российской Федерации БЦЖ вводят трехкратно детям, не имеющим противопоказаний после рождения, и помимо протективного действия она способна вызывать ряд поствакцинальных осложнений, таких как воспалительные реакции, проявляющиеся в виде инфильтратов, абцессов, свищей и язв [4]. Недостатком БЦЖ является также то, что эта вакцина не обеспечивает защиту от туберкулеза легких у взрослых [5]. В случае туберкулеза с множественной или широкой лекарственной устойчивостью требуется использовать дорогостоящие и при этом токсичные препараты химиотерапии [6]. С учетом вышесказанного актуальной становится задача поиска новых эффективных вакцин против туберкулеза для подростков и взрослых, в том числе для профилактики и иммунотерапии туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью.

Основная цель вакцинации — предупреждение развития заболевания. В случае туберкулеза Т-клеточный ответ играет ключевую роль в элиминации патогена, и основной эффект вакцинации, обеспечивающий протективное действие против туберкулеза, заключается в формировании CD4⁺-клеток памяти. CD8⁺-клетки, в свою очередь, обеспечивают контроль распространения микобактерий при хроническом туберкулезе. Секретция провоспалительного цитокина IFN γ Т-клетками ассоциируется с протективным действием вакцин [7].

При поиске новых противотуберкулезных вакцин исследователи чаще всего обращаются к субъединичным белковым вакцинам или вирусным векторам [8], но на сегодняшний день исследователи предлагают новые дизайны вакцин на основе мРНК. Так, показана способность самореплицирующейся мРНК вакцины вызывать специфичный ответ CD4⁺- и CD8⁺-клеток [9]. При сравнении с другими типами вакцин мРНК-вакцины обладают рядом преимуществ. Они обеспечивают на порядок более высокий титр антител при сравнении с вакцинами на основе белковых антигенов. При этом стоимость их производства и масштабирования ниже, поскольку для этого используют бесклеточный способ наработки [10]. В сравнении с ДНК-вакцинами, мРНК-вакцины менее генотоксичны, поскольку не способны встраиваться в геном [10], а также более эффективны, поскольку выполняют свою функцию в цитозоле клетки, а не ядре, как ДНК-вакцины, что делает их эффективность не зависимой от этапа клеточного цикла при трансфекции [11].

В случае перехода от аттенуированных вакцин к белковым или к вакцинам на основе нуклеиновых кислот,

возникает проблема выбора эпитопа для иммунизации. Чаще всего используют субъединичные вакцины, которые содержат последовательность одного белка [12], но также есть варианты вакцин, содержащие эпитопы от одного или нескольких антигенов патогена, что может приводить к синергическому иммунному ответу [13]. Подобные вакцины называются мультиэпитопными. Гуморальный и Т-клеточный ответ вызывают разные эпитопы. В-клеточные эпитопы могут быть нелинейными, повторяя нативную конформацию белка, и линейными, в то время как Т-клеточные эпитопы представляют собой короткие пептиды. Использование мультиэпитопных вакцин позволяет индуцировать оба типа иммунных реакций одновременно. Для предсказания эпитопов противотуберкулезных мРНК вакцин активно используют биоинформатические инструменты [14, 15]. При этом использование коротких пептидов в составе мультиэпитопной вакцины позволяет избежать возможных аллергических реакций, появляющихся в случае использования аттенуированных вакцин [16]. Помимо этого, мультиэпитопная вакцина может содержать эпитопы антигенов различных микроорганизмов, что приводит к эффективной иммунизации против нескольких возбудителей одновременно [13].

Однако число экспериментальных работ, в которых сравнивали эффективность мРНК-вакцин, кодирующих полноразмерные и мультиэпитопные варианты антигенов, ограничено. Таким образом, целью нашего исследования было оценить выраженность Т-клеточного ответа у мышей, иммунизированных мРНК-вакцинами, которые кодируют полноразмерный или мультиэпитопный антиген *M. tuberculosis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента

В эксперименте были использованы 15 самцов мышей C57BL/6/J в возрасте 8–9 недель SPF-статуса и массой 19–21 г, полученные из Центра генетических ресурсов лабораторных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Содержались в условиях конвенционального вивария при фиксированном световом режиме 12.00 : 12.00 ч. Стандартный корм (гранулы) и воду животные получали без ограничения. Мыши были иммунизированы внутримышечно двумя различными вариантами мРНК-вакцин: mRNA Rv3875 (582 нуклеотида) или mRNA mEpitope (699 нуклеотида) по 50 мкг РНК каждой. Кроме того, мыши были иммунизированы полноразмерным белком Rv3875 (25 мг) в качестве адьюванта, к которому были использованы липидные наночастицы, не содержащие мРНК, в количестве, эквивалентном ($\pm 10\%$) количеству частиц в группах с РНК-вакцинами. Помимо экспериментальных групп, были созданы две контрольные группы: первая — с введением липидных наночастиц без мРНК, вторая — с введением фосфатного буфера. В каждой группе было по три животных. Через четыре недели после первой иммунизации животные были иммунизированы повторно теми же дозами препаратов. Забой мышей и выделение селезенки осуществляли через четыре недели после второй иммунизации (рис. 1).

Выбор эпитопов для мультиэпитопной конструкции Rv3875

Для предсказания эпитопов MHC I использовали пакет MHCFlurry 2.0 версии 2.0.4 [17], для предсказания эпитопов

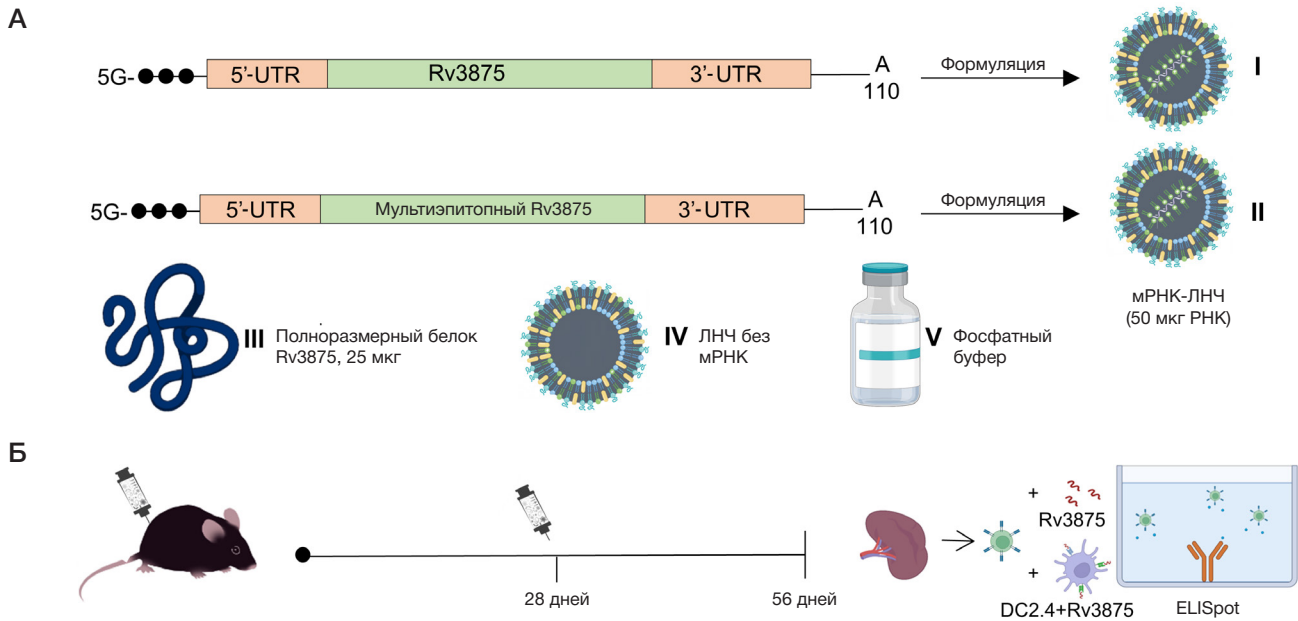


Рис. 1. Дизайн эксперимента. **А.** Схематичное представление состава мРНК-ЛНЧ-вакцины и остальных препаратов. **Б.** Дизайн эксперимента на мышах C57BL6/J. Мыши были иммунизированы внутримышечно двумя различными вариантами мРНК-вакцин: mRNA Rv3875 (582 нуклеотида) или mRNA mEpitope (699 нуклеотида) по 50 мкг РНК каждой. Кроме того, мышам иммунизировали полноразмерным белком Rv3875 (25 мкг), в качестве адьюванта к которому были использованы липидные наночастицы не содержащие мРНК в количестве эквивалентном (\pm) количеству частиц в группах с РНК-вакцинами. Помимо экспериментальных групп, были образованы две контрольные группы: первая с введением липидных наночастиц без мРНК, вторая с введением фосфатного буфера. В каждой группе было по три животных. Через четыре недели после первой иммунизации животные были иммунизированы повторно теми же дозами препаратов. Забой мышам и выделение селезенки осуществляли через четыре недели после второй иммунизации. Уровень сформированного Т-клеточного ответа у вакцинированных мышам определяли по количеству спленоцитов, секретирующих IFN γ в ответ на белок туберкулеза Rv3875 с помощью метода ELISpot

MHC II — пакет NetMHCIIpan 4.1 [18]. Для расчета эпитопов были выбраны опции длины возможных эпитопов: «-length» = 13,14,15,16,17 и «-BA», для того чтобы включить режим предсказания аффинности для пары эпитоп-аллель. Количественные характеристики частот аллелей были получены на основе опубликованных данных [19, 20]. Полученные предсказания результатов MHCFlurry 2.0 и NetMHCIIpan 4.1 отфильтровывали в среде Python 3.9. Каждая пара эпитоп-аллель должна взаимодействовать с аффинностью не более 500 нМ, каждый эпитоп должен связываться как минимум с 5 различными аллелями. С помощью такого алгоритма было отобрано два эпитопа для MHC I (LLDEGKQSL и AAWGGSGSEAY) и три эпитопа для MHC II (WNFAGIEAAASAIQG, KQSLTKLAAAWGGSG и LNNALQNLARTISEA). Финальная конструкция содержала пять эпитопов (по одной копии каждого эпитопа), соединенных между собой линкерами (KK для MHCII и AAY для MHC I). Кроме того, в конструкцию была добавлена последовательность цитоплазматического и трансмембранного домена MHC класса I (IVGIVAGLAV LAVVIGAVVATVMCRRKSSGKGGSSYSQAASSDSAQGS VSLTA), который обеспечивает колокализацию целевого белка с комплексами гистосовместимости в различных эндоцитарных компартментах [21].

Клонирование

С целью получения конструкций для последующей *in vitro* транскрипции РНК в коммерческий вектор pSmart (Lucigen; США) встраивали кассету, содержащую последовательность 5'-UTR (gggaataagagagaagaagagt aagaagaatataagaccccgccgscgscacc), последовательность белка Rv3875 (полноразмерного или мультиэпитопного) и 3'-UTR (gctggagcctcggctggcctagctcttggccctggcctccc cccagccctcctcccctcctcgcacccgtagcccgctgtcttgaataaagctc gtagtggcgccga). Затем полученную кассету обрабатывали

рестриктазами EcoRI и BglII, очищали на агарозном геле и осуществляли лигирование с аналогично подготовленным коммерческим вектором pSmart (Lucigen; США). Химически компетентные клетки NEB-stable (New England Biolabs; Великобритания) трансформировали лигазной смесью и высевали на LB-агар, содержащий ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Колонии на наличие вставки проверяли методом ПЦР. Верификацию плазмид осуществляли секвенированием по Сэнгеру. Анализ хроматограмм секвенирования проводили с помощью программы Ugene v38.1. *E. coli* NEB-stable с вектором культивировали при 30 °C и 180 rpm. Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с использованием набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen; США). Для получения линеаризованной плазмиды препарат обрабатывали рестриктазой SpeI по уникальному сайту рестрикции, расположенному после поли(A)-хвоста.

Для получения конструкции и наработки полноразмерного белка Rv3875 использовали вектор pET30 (Agilent; США). Последовательность Rv3875 с дополнительной последовательностью для шести гистидинов на N-конце была собрана из олигонуклеотидов с помощью ПЦР. Полученную кассету обрабатывали рестриктазами EcoRI и NdeI, очищали на агарозном геле и осуществляли лигирование с аналогично подготовленным коммерческим вектором pET30 (Agilent; США). Для трансформации использовали клетки BL21DE3 (Agilent; США). Верификацию плазмид осуществляли секвенированием по Сэнгеру.

In vitro транскрипция мРНК

In vitro транскрипцию проводили, как описано ранее [22]. Использовали 5 мкг линеаризованной плазмиды, буфер (20 mM DTT, 2 mM спермидина, 80 mM HEPES-КОН pH 7,4, 24 mM MgCl₂), 500 единиц T7 РНК-полимеразы («Биолабмикс»;

Россия), 200 единиц ингибитора рибонуклеаз RiboCare («Евроген»; Россия) и 1 мкл смеси ферментов из набора RiboMAX Large Scale RNA Production System (Promega; США) в качестве источника неорганической пирофосфатазы. Реакционная смесь содержала также 12 мМ аналога кэпа ARCA («Биолабмикс»; Россия) и по 3 мМ каждого из рибонуклеозид трифосфатов («Биосан»; Россия). Реакцию проводили 2 ч при температуре 37 °С, после чего добавляли еще по 3 мМ каждого из рибонуклеозид трифосфатов и инкубировали в течение еще 2 ч. ДНК гидролизовали при помощи нуклеазы RQ1 (Promega; США), РНК преципитировали добавлением LiCl до концентрации 0,32 М и EDTA pH 8,0 до концентрации 20 мМ с последующей инкубацией на льду в течение часа. Далее раствор центрифугировали в течение 15 мин (25 000 g при 4°C). Осадок РНК промывали 70%-м этанолом, растворяли в ультрачистой воде и еще раз преципитировали спиртом по стандартной методике. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм. Целевую длину и гомогенность синтезированных РНК молекул оценивали с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent; США).

Формуляция мРНК в ЛНЧ

Формулирование мРНК в липидные наночастицы проводили путем смешивания водного раствора (10 мМ цитратный буфер, pH 3,0) 0,2 мг/мл мРНК со спиртовым раствором смеси липидов в микрофлюидном картридже на приборе The NanoAssemblr™ Benchtop (Precision Nanosystems; США). Липидная смесь содержала следующие компоненты: ионизируемый липидоид ALC-0315 (BroadPharm; США), дистеароилфосфатидилхолин (DSPC) (Avanti Polar Lipids; США), холестерин (Sigma-Aldrich; США), DMG-PEG-2000 (BroadPharm; США) в молярном соотношении (%) 46,3 : 9,4 : 42,7 : 1,6. Массовая доля мРНК в ЛНЧ составляла 0,04% масс. Для формирования частиц водную и спиртовую фазы смешивали в соотношении 3 : 1 по объему с общей скоростью смешивания 10 мл/мин.

Затем частицы фильтровали в стерильных условиях через фильтр с мембраной из PES 0,22 мкм (Merck; США) и хранили при 4 °С. После фильтрации качество полученных частиц анализировали по двум параметрам: размер частиц (Zetasizer Nano ZSP, Malvern Panalytical; США) и загрузки мРНК. Концентрацию загруженной в липидные наночастицы мРНК определяли по разнице значений уровня флуоресцентного сигнала при окрашивании реагентом RiboGreen (Thermo Fischer Scientific; США) суспензии частиц до их разрушения и после. Для разрушения частиц использовали детергент Triton X-100 (Sigma-Aldrich; США).

Наработка и очистка белка Rv3875

Для наработки белка *E. coli* BL21DE3 с вектором культивировали при 37 °С и 180 rpm до $OD_{600} = 0,65$. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и культивировали клетки 6 ч при 30 °С. Клетки ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl pH 8,0 и 300 мМ хлорида натрия. Далее проводили лизис клеток ультразвуком с длительностью импульса 15 с и промежутком между импульсами 15 с. Амплитуда ультразвуковых колебаний составляла 50% от максимальной. После лизиса образцы центрифугировали

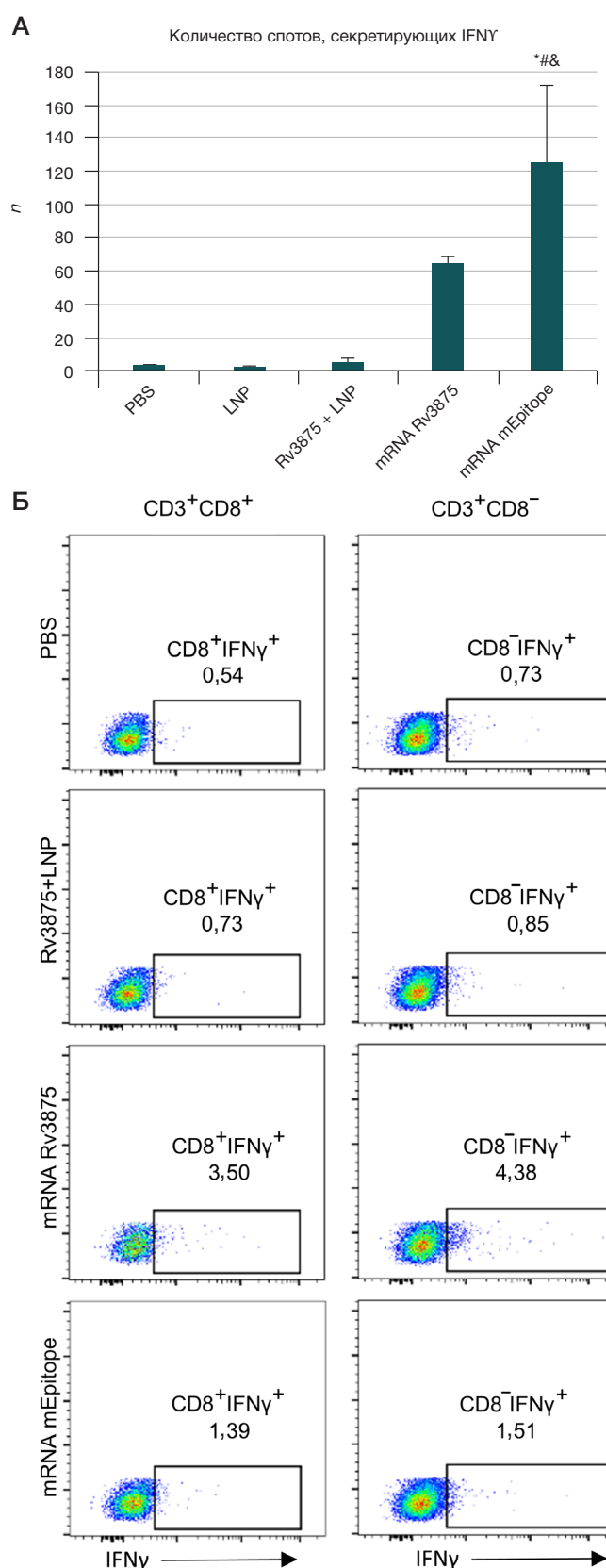


Рис. 2. Оценка Т-клеточного ответа спленоцитов иммунизированных мышей. **А.** Результаты ELISpot. Количество клеток, секретирующих IFN γ в ответ на стимуляцию DC2.4, активированных белком Rv3875. Данные представлены как среднее \pm ошибка среднего. По три животных в группе. * — $p < 0,05$ по сравнению с группой PBS; # — $p < 0,05$ по сравнению с группой LNP; & — $p < 0,05$ по сравнению с группой Rv3875 + LNP. **Б.** Репрезентативные данные по внутриклеточному окрашиванию CD3⁺-Т-лимфоцитов (CD8⁺ и CD8⁻), продуцирующих IFN γ . Цифры показывают процент клеток от общего пула CD3⁺CD8⁻- и CD3⁺CD8⁺-Т-лимфоцитов, которые продуцируют IFN γ .

в течение 15 мин (20 000 g при 4 °C). pH полученного после центрифугирования супернатанта доводили до 7,5 путем добавления раствора 1 M Tris-OH. Затем испытуемый образец подвергали фильтрации через полиэфирсульфоновую мембрану с диаметром пор 0,22 мкм.

Первый этап очистки белка Rv3875 осуществляли с использованием металлохелатного аффинного сорбента со средним размером частиц 30 мкм. На сорбент с иммобилизованным хелатирующим лигандом (нитрилтриуксусной кислотой) наносили лизат клеток и элюировали в градиенте имидазола. Затем фракции очищенного белка диализовали против буфера, содержащего 25 mM Tris-HCl. Диализованный образец наносили на сильный катионообменный сорбент со средним размером частиц 45 мкм и иммобилизованными на них функциональными сульфогруппами ($-SO_3^-$). Массу Rv3875 проверяли как с помощью классического метода электрофореза в полиакриламидном геле, так и с помощью масс-спектрометра maxis 4G ETD (Bruker; США).

Оценка уровня Т-клеточного ответа после вакцинации

Уровень сформированного Т-клеточного ответа у вакцинированных мышей определяли по количеству спленоцитов, секретирующих IFN γ в ответ на белок туберкулеза Rv3875 с помощью метода ELISpot.

Из селезенок вакцинированных и контрольных мышей выделяли спленоциты протиранием через фильтр 70 мкм. Спленоциты высаживали в количестве 300 тыс. клеток (BD; США) в ELISpot планшеты с PVDF-мембраной с одновременной стимуляцией. Стимуляцию осуществляли белком Rv3875 (50 мкг/мл) и дендритными клетками линии DC2.4 в количестве 30 тыс. клеток на лунку. Каждую экспериментальную лунку ставили в двух технических повторах. После посадки спленоцитов и добавления стимуляторов суммарный объем лунки составлял 200 мкл питательной среды RPMI-1640 («ПанЭко»; Россия) с 10% FCS. Далее спленоциты культивировали 18 ч в CO $_2$ -инкубаторе (5% CO $_2$, 37 °C).

По истечении срока культивирования спленоциты, секретирующие IFN γ , выявляли с помощью наборов Mouse IFN γ ELISpot Set (BD; США) и AEC Substrate Set (BD; США), согласно инструкции производителя. Подсчет точек, соответствующих спленоцитам, секретирующим IFN γ , производили на приборе S6 Ultra (CTL; США).

Цитометрическое определение IFN-продуцирующих клеток

Для цитометрического определения IFN γ -продуцирующих клеток спленоциты вакцинированных мышей высаживали в 200 мкл среды RPMI-1640 в культуральный 96-луночный планшет в количестве 300 тыс. на лунку и стимулировали белком Rv3875 (50 мкг/мл) или оставляли нестимулированными. Через 2 ч после начала стимуляции в лунки добавляли Брефелдин А (Abcam; США) в концентрации 10 мкг/мл. Далее клетки культивировали ночь в CO $_2$ -инкубаторе. По окончании инкубации клетки окрашивали анти-CD3 (PE Anti-Mouse CD3, Elabscience) и CD8-антителами (FITC Anti-Mouse CD8a, Elabscience) в концентрации согласно инструкции производителя, фиксировали и пермеабелизировали коммерческим набором (BD; США) согласно инструкции производителя. Полученные пробы анализировали на проточном цитометре LSRFortessa (BD; США). Пример

гейтирования представлен в Приложении 1. Полученные данные обрабатывали в программе FlowJo (Treestar Inc.; США).

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ ANOVA и Turkey's-тест в качестве post-hoc-анализа. Различия между экспериментальными группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Анализ данных производили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (Statsoft Inc.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ Т-клеточного ответа методом ELISpot на IFN γ -секретирующие клетки показал эффективность вакцинации [$F(10,4) = 6,02$; $p = 0,012$]. Количество IFN γ -секретирующих клеток в ответ на стимуляцию DC2.4+Rv3875 было выше в спленоцитах мышей, вакцинированных мультиэпитопным вариантом мРНК-вакцины (mRNA mEpitope) по сравнению с контрольными группами (PBS, LNP) или спленоцитами мышей, иммунизированных белком Rv3875 с наночастицами без РНК (Rv3875+LNP) (рис. 2А). Количество IFN γ -секретирующих клеток среди спленоцитов мышей, иммунизированных мРНК-вакциной, кодирующей полноразмерный белок Rv3875, было также выше, чем у контроля ($64 \pm 2,7$ vs $2,5 \pm 1,0$) однако эти изменения статистически не достоверны. Следует отметить, что спленоциты мышей, иммунизированных белком Rv3875 с «пустыми» ЛНЧ без мРНК, демонстрировали лишь незначительное увеличение IFN γ -секретирующих клеток по сравнению со спленоцитами после иммунизации мРНК-вакцинами (Rv3875: $5,7 \pm 1,8$; mRNA Rv3875: $64,0 \pm 2,7$; mRNA mEpitope: $126,0 \pm 46,2$). Данные по спленоцитам отдельных животных представлены в Приложении 2.

Цитометрическое исследование было проведено на спленоцитах одного животного из каждой группы. Поэтому отсутствует статистическая обработка данных, результаты приведены для наглядности. По нашим данным, процент Т-лимфоцитов CD3 $^+$ CD8 $^+$ и CD3 $^+$ CD8 $^-$, продуцирующих IFN γ , выше в спленоцитах мышей, иммунизированных мРНК-вакцинами (рис. 2Б). Таким образом, данные по цитометрии подтверждают, что повышенная секреция IFN γ в спленоцитах мышей, вакцинированных mRNA Rv3875 и mRNA mEpitope, обеспечивается в том числе за счет Т-лимфоцитов, что говорит о формировании Т-клеточного ответа на антигены микобактерии туберкулеза у вакцинированных мышей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наши результаты показали, что иммунизация мРНК-вакциной, кодирующей мультиэпитопный белок Rv3875 (ESAT6) *M. tuberculosis*, приводит к более выраженному Т-клеточному ответу, как по сравнению с иммунизацией мРНК-вакциной, кодирующей полноразмерный вариант белка, так и по сравнению с иммунизацией рекомбинантным белком. Эти результаты могут быть вызваны как более эффективной презентацией эпитопов комплексами гистосовместимости I и II типов, так и связаны с выбором наиболее иммуногенных эпитопов [11]. Повышение эффективности презентации может быть обусловлено правильным расщеплением белковой молекулы по протеосомному и лизосомному

пути, которое обеспечивается путем добавления последовательностей расщепляющихся линкеров [23]. Кроме того, на иммуногенность оказывают влияние лидерные последовательности. В качестве такой последовательности мы использовали последовательность цитоплазматического и трансмембранного домена МНС класса I на карбоксильном конце белковой молекулы. Ранее было показано, что лидерная последовательность с транспортным сигналом МНС класса I обеспечивает ко-локализацию целевого белка с комплексами гистосовместимости в различных эндоцитарных компартментах и, как результат, приводит к эффективной активации и экспансии антиген-специфичных CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток [21].

Еще одним несомненным преимуществом мультиэпитопных вакцин является возможность «настройки» Т-клеточного ответа за счет выбора специфичных эпитопов. В нашем исследовании мы использовали вакцину, кодирующую пять эпитопов Rv3875, три из которых презентуются с помощью МНС класса II и два с помощью МНС класса I, что обеспечивает специфичную активацию CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток. Несмотря на то что эпитопы были отобраны по сродству к человеческим аллелям, а не мышинным, мультиэпитопная мРНК-вакцина все равно показала высокую эффективность, вероятно, за счет высокой межвидовой кросс-реактивности. Т-клеточный ответ вносит основной вклад в борьбу с *M. tuberculosis*. CD8⁺-Т-лимфоциты способны уничтожать инфицированные фагоцитирующие клетки при помощи белков перфорина, гранзима и гранулизина, а также индукции апоптоза через FasL-рецептор, при этом секретируемый гранулизин может непосредственно вызывать гибель *M. tuberculosis*. Важнейшей функцией CD4⁺-клеток при борьбе с *M. tuberculosis* является выработка IFN γ , активирующего макрофаги и цитотоксические Т-лимфоциты. Сниженная эффективность БЦЖ у некоторых индивидов может быть связана с недостаточной индукцией CD8⁺-Т-клеток [24].

Использование мРНК вакцин против туберкулеза было также продемонстрировано в двух экспериментальных

работах, которые показали непоследовательные результаты [9, 25]. В исследовании по разработке противотуберкулезной мРНК-вакцины на основе полноразмерного MPT83-антигена были обнаружены иммуногенные свойства такой вакцины [25]. При иммунизации она была способна вызывать выработку специфичных антител. Т-клетки, выделенные из селезенки мышей, секретировали IFN γ в ответ на стимуляцию антигеном, а CTL были способны лизировать трансфецированные антигеном клетки, что согласуется с полученными нами результатами. В аналогичном исследовании 2022 г. использовали мРНК ID91, содержащую четыре туберкулезных полноразмерных антигена, слитых с синтетическим агонистом TLR4, причем мРНК являлась самореплицирующейся [9]. Сравнение такой мРНК вакцины с белковой вакциной показало аналогичное увеличение титра антител, но менее выраженный Т-клеточный ответ. В нашем исследовании впервые была использована мультиэпитопная мРНК вакцина против туберкулеза. Результаты показали более выраженные эффекты по сравнению с полноразмерной мРНК-вакциной. Вероятно, дальнейшее использование мультиэпитопных вакцин для профилактики туберкулеза может быть более перспективно по сравнению с белковыми и полноразмерными мРНК-вакцинами.

ВЫВОДЫ

Мультиэпитопная мРНК-вакцина приводит к выраженному Т-клеточному ответу у мышей при внутримышечном способе введения. Усиление Т-клеточного ответа может быть ключевым в разработке эффективной профилактической вакцины против *M. tuberculosis*. Вакцины к новым эпитопам туберкулеза могли бы усилить Т-клеточный ответ и ускорить вовлечение клеток адаптивного иммунитета в иммунный ответ в первые две недели заражения, обеспечивая более эффективную элиминацию патогена. Таким образом, мультиэпитопные вакцины на основе мРНК-молекул могут иметь хороший потенциал для разработки эффективной вакцины против *M. tuberculosis*.

Литература

1. Dartois VA, Rubin EJ. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nat Rev Microbiol*. 2022; 20 (11): p. 685–701.
2. Васильева И. А., Тестов В. В., Стерликов С. А. Эпидемическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19–2020–2021 гг. *Туберкулез и болезни легких*. 2022. 100 3: 6–12.
3. Ahmed A, et al. A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological reviews*. 2021; 301 (1): 98–121.
4. Шалофаст Е. И., Ершова Ю. И. Поствакцинальные осложнения при «БЦЖ» иммунизации. *Вестник науки*. 2022; 4, 11 (56): 341–55.
5. Covian, C., et al., BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol*. 2019; 10: 2806.
6. Николенко Н. Ю., Кудлай Д. А., Докторова Н. П. Фармакоэпидемиология и фармакоэкономика туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. *Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология*. 2021; 14 (2): 235–48.
7. Counoupas C, Triccas JA. The generation of T-cell memory to protect against tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2019; 97 (7): 656–63.
8. Bouzeyen R, Javid B, Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview. *Front Immunol*. 2022; 13: 878471.
9. Larsen SE, et al. An RNA-based vaccine platform for use against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines*. 2023; 11 (1): 130.
10. Tian Y, Deng Z, Yang P. mRNA vaccines: A novel weapon to control infectious diseases. *Front Microbiol*. 2022; 13: 1008684.
11. Melo A, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes (Basel)*. 2022; 13 (12).
12. Heidary M, et al. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Front Microbiol*. 2022; 13: 927306.
13. Teran-Navarro H, et al. A comparison between recombinant *listeria* GAPDH proteins and GAPDH encoding mRNA conjugated to lipids as cross-reactive vaccines for *Listeria*, *Mycobacterium*, and *Streptococcus*. *Front Immunol*. 2021; 12: 632304.
14. Al Tbeishat H. Novel in silico mRNA vaccine design exploiting proteins of *M. tuberculosis* that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Scientific Reports*. 2022. 12 (1): 1–19.
15. Shahrear S, Islam ABMMK. Modeling of MT. P495, an mRNA-based vaccine against the phosphate-binding protein PstS1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Diversity*. 2022; 1–20.
16. Kar T, et al. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-

- CoV-2. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 10895.
17. O'Donnell TJ, Rubinsteyn A, Laserson U. MHCflurry 2.0: improved pan-allele prediction of MHC class I-presented peptides by incorporating antigen processing. *Cell Syst.* 2020; 11 (1): 42–48.
 18. Reynisson B, et al. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *J Proteome Res.* 2020; 19 (6): 2304–15.
 19. Greenbaum J, et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 2011; 63 (6): 325–35.
 20. Weiskopf D, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110 (22): E2046–53.
 21. Kreiter S, et al. Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. *J Immunol.* 2008; 180 (1): 309–18.
 22. Kirshina A, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
 23. Yano A, et al. An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine.* 2005; 23 (17–18): 2322–6.
 24. Hess J, Kaufmann SH. Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 23 (2): 165–73.

References

1. Dartois VA, Rubin EJ. Anti-tuberculosis treatment strategies and drug development: challenges and priorities. *Nat Rev Microbiol.* 2022. 20 (11): p. 685–701.
2. Vasileva IA, Testov VV, Sterilikov SA. Ehpidehmicheskaya situaciya po tuberkulezu v gody pandemii COVID-19–2020–2021 gg. Tuberkulez i bolezni legkix. 2022. 100 3: 6–12. Russian.
3. Ahmed A, et al. A century of BCG: Impact on tuberculosis control and beyond. *Immunological reviews.* 2021; 301 (1): 98–121.
4. Shalofast EI, Ershova Yul. Postvakkinal'nye oslozhneniya pri «BCZh» immunizacii. *Vestnik nauki.* 2022; 4, 11 (56): 341–55. Russian.
5. Covian C., et al., BCG-Induced Cross-Protection and Development of Trained Immunity: Implication for Vaccine Design. *Front Immunol.* 2019; 10: 2806.
6. Nikolenko NYu, Kudlaj DA, Doktorova NP. Farmakoehpidemiologiya i farmakoehkonomika tuberkuleza s mnozhestvennoj i širokoj lekarstvennoj ustojchivost'yu vozbuditelya. *Farmakoehkonomika. Sovremennaya farmakoehkonomika i farmakoehpidemiologiya.* 2021; 14 (2): 235–48. Russian.
7. Counoupas C, Triccas JA. The generation of T-cell memory to protect against tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2019; 97 (7): 656–63.
8. Bouzeyen R, Javid B, Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview. *Front Immunol.* 2022; 13: 878471.
9. Larsen SE, et al. An RNA-based vaccine platform for use against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccines.* 2023; 11 (1): 130.
10. Tian Y, Deng Z, Yang P. mRNA vaccines: A novel weapon to control infectious diseases. *Front Microbiol.* 2022; 13: 1008684.
11. Melo A, et al. Third-generation vaccines: features of nucleic acid vaccines and strategies to improve their efficiency. *Genes (Basel).* 2022; 13 (12).
12. Heidary M, et al. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Front Microbiol.* 2022; 13: 927306.
13. Teran-Navarro H, et al. A comparison between recombinant *Listeria* GAPDH proteins and GAPDH encoding mRNA conjugated to lipids as cross-reactive vaccines for *Listeria*, *Mycobacterium*, and *Streptococcus*. *Front Immunol.* 2021; 12: 632304.
14. Al Tbeishat H. Novel in silico mRNA vaccine design exploiting proteins of *M. tuberculosis* that modulates host immune responses by inducing epigenetic modifications. *Scientific Reports.* 2022. 12 (1): 1–19.
15. Shahrear S, Islam ABMMK. Modeling of MT. P495, an mRNA-based vaccine against the phosphate-binding protein PstS1 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Diversity.* 2022; 1–20.
16. Kar T, et al. A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 10895.
17. O'Donnell TJ, Rubinsteyn A, Laserson U. MHCflurry 2.0: improved pan-allele prediction of MHC class I-presented peptides by incorporating antigen processing. *Cell Syst.* 2020; 11 (1): 42–48.
18. Reynisson B, et al. Improved prediction of MHC II antigen presentation through integration and motif deconvolution of mass spectrometry MHC eluted ligand data. *J Proteome Res.* 2020; 19 (6): 2304–15.
19. Greenbaum J, et al. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics.* 2011; 63 (6): 325–35.
20. Weiskopf D, et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110 (22): E2046–53.
21. Kreiter S, et al. Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals. *J Immunol.* 2008; 180 (1): 309–18.
22. Kirshina A, Kolosova E, Imasheva E, Vasileva O, Zaborova O, Terenin I, et al. Effects of various mRNA-LNP vaccine doses on neuroinflammation in BALB/c mice. *RSMU.* 2022; 6.
23. Yano A, et al. An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine.* 2005; 23 (17–18): 2322–6.
24. Hess J, Kaufmann SH. Live antigen carriers as tools for improved anti-tuberculosis vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999; 23 (2): 165–73.

АКТИВАЦИЯ МИКРОГЛИИ В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

В. В. Гусельникова^{1,2}✉, В. А. Разенкова¹, Д. А. Суфиева¹, Д. Э. Коржевский¹¹ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Артериальная гипертензия является одной из наиболее значимых медико-социальных проблем, что обусловлено широкой распространенностью этого заболевания и сопутствующим риском развития почечной недостаточности, сердечно-сосудистых и сосудисто-мозговых осложнений. Целью работы было изучение морфофункционального состояния микроглии разных отделов головного мозга крысы в условиях развития артериальной гипертензии. Материалом для исследования служили образцы головного мозга спонтанно гипертензивных крыс линии SHR в возрасте 3–8 месяцев ($n = 4$). В качестве контроля использовали нормотензивных крыс линии WKY той же возрастной группы ($n = 3$). Работа выполнена с применением методов иммуногистохимического анализа и конфокальной лазерной микроскопии. При проведении количественного анализа определяли количество тел микроглияцитов и площадь, занимаемую телами и отростками этих клеток, на 1 мм^2 нервной ткани. В результате постановки иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1 обнаружено, что у крыс с артериальной гипертензией микроглия в коре головного мозга, стриатуме, субкортикальном белом веществе и субфорникальном органе имеет морфологические признаки активации (увеличение размера тела и утолщение отростков). Наиболее сильную активацию демонстрирует микроглия субфорникального органа, которая у нормотензивных крыс находится в преактивированном состоянии. Проведенный статистический анализ позволил выявить тенденцию увеличения количества микроглии в головном мозге у крыс линии SHR по сравнению с животными контрольной группы. При двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 не выявлено изменений в количестве и/или распределении лизосомного белка CD68 у спонтанно гипертензивных крыс по сравнению с контролем. Полученные результаты свидетельствуют о хронической активации микроглии в головном мозге у крыс на фоне развития артериальной гипертензии. Активация микроглии в данном случае не сопровождается усилением фагоцитарной активности этих клеток.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, микроглия, SHR, Iba1, CD68, субфорникальный орган

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, проект № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>.

Вклад авторов: Гусельникова В. В. — анализ литературы, анализ и интерпретация результатов, подготовка рукописи; Разенкова В. А. — отработка протоколов иммунофлуоресцентных реакций, проведение конфокальной лазерной микроскопии; Суфиева Д. А. — гистологическая проводка биологического материала, постановка иммуногистохимических реакций для световой микроскопии; Коржевский Д. Э. — разработка концепции, планирование исследования, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол №1/22 от 18 февраля 2022 г., протокол № 3/19 от 25 апреля 2019 г.), проведено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013 г.).

✉ **Для корреспонденции:** Валерия Владимировна Гусельникова
ул. Акад. Павлова, д. 12, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия; guselnicova.valeriia@yandex.ru

Статья получена: 05.06.2023 **Статья принята к печати:** 20.06.2023 **Опубликована онлайн:** 27.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.024

ACTIVATION OF MICROGLIA IN THE BRAIN OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Guselnikova VV^{1,2}✉, Razenkova VA¹, Sufieva DA¹, Korzhevskii DE¹¹ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia² St Petersburg University, St. Petersburg, Russia

Arterial hypertension is one of the most significant medical and social problems, being widespread and associated with the risk of renal failure, cardiovascular and cerebrovascular complications. The aim was to investigate the morphofunctional state of microglia in different regions of the rat brain in the setting of arterial hypertension. Brain samples from spontaneously hypertensive SHR rats aged 3–8 months ($n = 4$) were used as study material. Normotensive WKY rats of the same age ($n = 3$) were used as the control group. The work was performed using immunohistochemical analysis and confocal laser microscopy. During the quantitative analysis, we were seeking to determine the number of microglia cell bodies and the area occupied by the bodies and processes of these cells per 1 mm^2 of the nervous tissue. An immunohistochemical reaction for calcium-binding protein Iba1 revealed that in rats with arterial hypertension, microglia in the cerebral cortex, striatum, subcortical white matter and subfornical organ showed morphological signs of activation: increased body size and thickening of the processes of these cells. The strongest activation is demonstrated by microglia of the subfornical organ, which is in a preactivated state in normotensive rats. The performed statistical analysis revealed a trend towards an increase in the amount of microglia in the brain in SHR rats compared to animals in the control group. The Iba1/CD68 double immunofluorescence reaction showed no changes in the amount and/or distribution of lysosomal CD68 protein in spontaneously hypertensive rats compared to control group. The results obtained indicate chronic activation of microglia in the brain of spontaneously hypertensive rats. Activation of microglia in this case is not accompanied by an increase in the phagocytic activity of these cells.

Keywords: arterial hypertension, microglia, SHR, Iba1, CD68, subfornical organ

Funding: the study was funded by the Russian Science Foundation, project № 22-25-00105, <https://rscf.ru/project/22-25-00105/>.

Author contribution: Guselnikova VV — literature analysis, analysis and interpretation of the results, preparation of the manuscript; Razenkova VA — development of protocols for immunofluorescent reactions, confocal laser microscopy; Sufieva DA — histological examination of biological material, performing immunohistochemical reactions for light microscopy; Korzhevskii DE — concept development, research planning, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Federal State Budgetary Scientific Institution "IEM" (protocol № 1/22 dated February 18, 2022, protocol № 3/19 dated April 25, 2019), and was conducted in accordance with the provisions of the Declaration of Helsinki (2013)

✉ **Correspondence should be addressed:** Valeria V. Guselnikova
Acad. Pavlov, 12, Saint-Petersburg, 197376, Russia; guselnicova.valeriia@yandex.ru

Received: 05.06.2023 **Accepted:** 20.06.2023 **Published online:** 27.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.024

На сегодняшний день артериальная гипертензия (АГ) остается одной из наиболее значимых медико-социальных проблем во всем мире. Согласно результатам совместного исследования ВОЗ и Имперского колледжа Лондона, количество людей с АГ за 30 лет (с 1990 по 2019 г.) увеличилось почти вдвое — с 650 млн до 1,28 млрд человек [1]. Распространенность АГ в России, по данным исследования ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации), в 2014 г. составила 44% в репрезентативной выборке пациентов в возрасте 25–65 лет. В результате эпидемиологического исследования, проведенного в 2019 г. с участием 20 607 жителей Российской Федерации, АГ была зарегистрирована у 14 853 (72,1%) обследованных [2]. Очевидно, что АГ является широко распространенным заболеванием в нашей стране, представляя серьезную проблему для отечественного здравоохранения. Несмотря на более чем столетний период изучения, АГ по-прежнему плохо поддается лечению, что, вероятно, связано со сложностью механизмов патогенеза, включающих множество взаимодействующих факторов, и нашим ограниченным пониманием этих механизмов на клеточном и молекулярном уровнях [3]. Это обуславливает актуальность дальнейших исследований в этой области.

При высокой распространенности в популяции Российской Федерации и недостаточной эффективности лечения и контроля АГ остается плохо управляемым фактором риска развития инфаркта миокарда, хронической сердечной недостаточности, внезапной смерти, почечной недостаточности, а также ишемического и геморрагического инсульта. Головной мозг является одним из органов-мишеней, наиболее рано поражаемых при АГ: в первую очередь страдают сосуды малого диаметра, в результате чего наблюдаются микрокровоизлияния, подкорковые лакунарные инфаркты и диффузное поражение белого вещества, что сопровождается снижением когнитивных функций [4]. Отмечено, что АГ сопровождается развитием в головном мозге хронического нейровоспаления [5]. Однако клеточные механизмы нейровоспаления, ассоциированные с АГ, неизвестны, и неясно, способствует ли нейровоспаление прогрессированию АГ. Так как воспаление в головном мозге вызывает и поддерживает главным образом микроглию, актуальным представляется проведение детального анализа этой клеточной популяции в условиях развития АГ. Получение новых данных о функциональном статусе микроглии головного мозга на фоне развития АГ может способствовать лучшему пониманию молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе развития этого заболевания. Целью работы было изучить морфофункциональное состояние микроглии разных отделов головного мозга крысы в условиях развития АГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве экспериментальной модели АГ использовали линию крыс SHR (Spontaneously Hypertensive Rats). У животных этой линии, выведенной К. Окамото и К. Аоки (1963) из нормотензивных крыс линии Wistar-Kyoto (WKY), спонтанно (без каких-либо предшествующих первичных заболеваний) развивается хроническая гипертензия, что является следствием нарушения функции 1–6 генов, участвующих в регуляции артериального давления. Стойкое повышение артериального давления до 190–200 мм рт. ст. у крыс линии SHR начинается с 12 недель

[6]. Линию SHR считают наиболее адекватной моделью эссенциальной гипертензии человека и широко используют для изучения патогенеза этого заболевания и разработки новых подходов к ее терапии [7, 8].

Материалом для исследования послужили образцы головного мозга спонтанно гипертензивных крыс-самцов линии SHR в возрасте 3–8 месяцев ($n = 4$). В качестве контроля использовали головной мозг крыс-самцов линии WKY того же возраста ($n = 3$). Систолическое артериальное давление у животных определяли в хвостовой артерии с использованием системы неинвазивного измерения кровяного давления у грызунов «Систола» («Нейроботикс»; Россия). Показатели артериального давления у крыс линии SHR составили 220 мм рт. ст., у крыс линии WKY — 85–100 мм рт. ст. Образцы головного мозга фиксировали в цинк-этанол-формальдегиде описанным ранее способом [9], после чего обезжовивали и заливали в парафин Type 6 (ThermoScientific; США). С парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм с использованием ротационного микротомы Microm HM 325 (ThermoScientific; США). Полученные препараты после депарафинирования и регидратации подвергали процедуре теплового демаскирования в 10%-м водном растворе тиосульфата натрия в течение 23 мин.

Для иммуногистохимического выявления Iba1 использовали кроличьи поликлональные антитела к Iba1 (Biocare Medical; США) в разведении 1 : 500. В качестве вторичных реагентов для выявления первичных антител использовали реагент HRP Conjugate из набора Reveal Polyvalent HRP DAB Detection System (Spring Bioscience; США). Пероксидазную метку выявляли с использованием диаминобензидинового хромогена из набора DAB+ (Agilent; США). После постановки иммуногистохимической реакции часть срезов подкрашивали квасцовым гематоксилином.

Для одновременного выявления Iba1 и CD68 на срезы наносили смесь кроличьих поликлональных антител к Iba1 (Biocare medical; США) в разведении 1 : 500 и мышинных моноклональных антител к CD68 (Agilent; США) в разведении 1 : 1000. Смесь первичных антител готовили в соотношении 1 : 1. В качестве вторичных реагентов применяли смесь (1 : 1) антител против иммуноглобулинов кролика, меченных биотином (из набора R&D Systems; США), и реагента EnVision+/HRP-AntiMouse (Agilent; США), в состав которого была добавлена нормальная сыворотка крысы для предотвращения неспецифического связывания антител. После инкубации в смеси вторичных антител срезы последовательно обрабатывали раствором конъюгата стрептавидина с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch; США) и раствором антител против HRP, конъюгированных с флуорохромом Cy3 (Jackson Immuno Research; США).

Для отрицательного контроля антител иммуногистохимическую обработку препаратов проводили без использования первичных антител, вместо которых на срезы наносили PBS. Положительная реакция в данном случае отсутствовала.

Анализ препаратов проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Leica; Германия) и конфокальном лазерном микроскопе LSM800 (Zeiss; Германия). Для возбуждения флуоресценции Cy2 применяли лазер с длиной волны 488 нм, для Cy3 — лазер с длиной волны 561 нм. Анализ полученных изображений осуществляли при помощи компьютерных программ LSM Image Browser и ZEN2012 (Zeiss; Германия).

При проведении количественного анализа определяли количество тел Iba1+ микроглиоцитов и площадь,

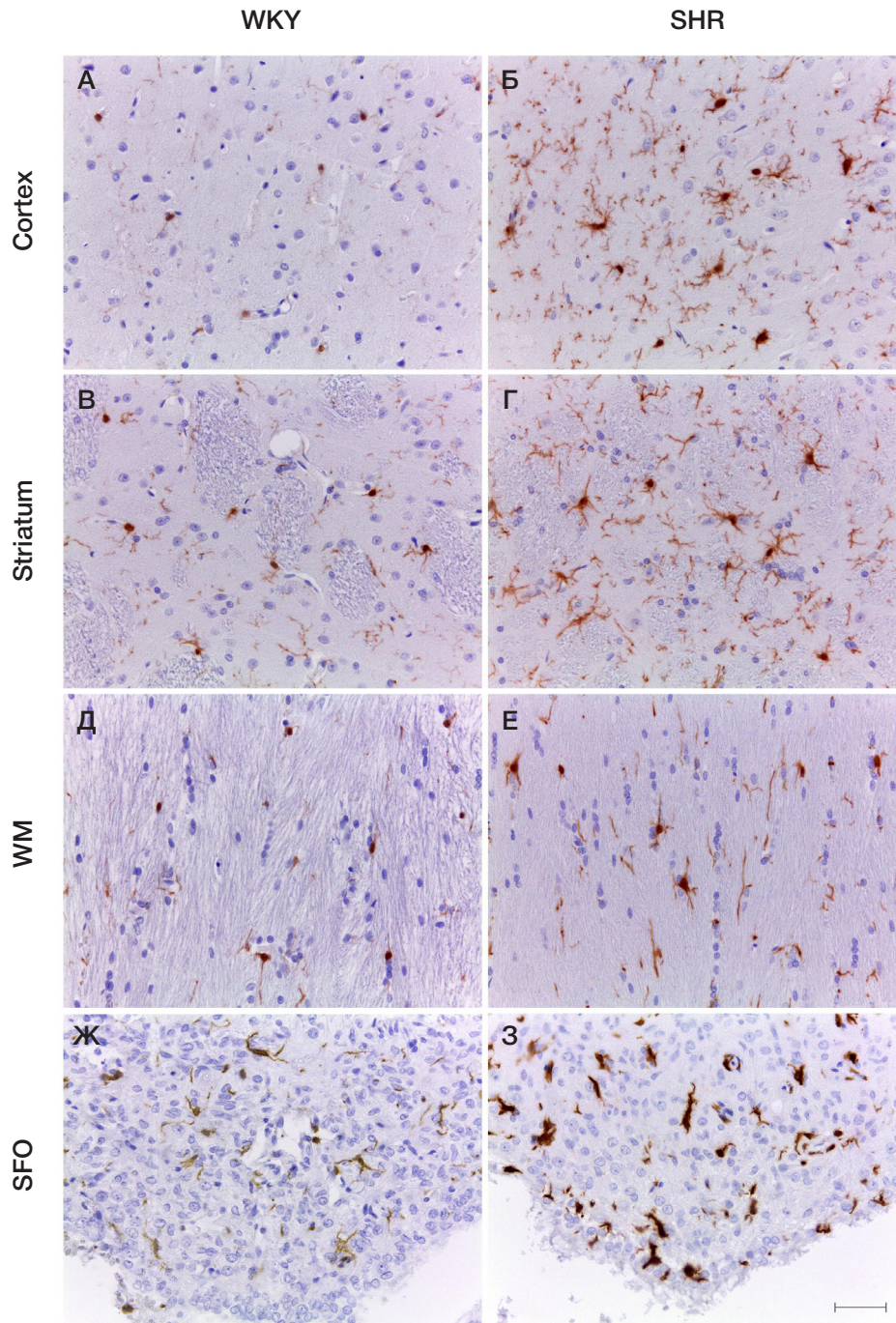


Рис. 1. Микроглия головного мозга крысы. WKY — нормотензивная линия крыс Wistar–Kyoto, SHR — линия спонтанно гипертензивных крыс. Cortex — участок коры больших полушарий головного мозга, Striatum — стриатум (*полосатое тело*), WM — субкортикальное белое вещество, SFO — субфорникальный орган. Иммуногистохимическая реакция на Iba1, подкраска квасцовым гематоксилином. Масштабный отрезок равен 50 мкм

занимаемую телами и отростками Iba1-иммунопозитивных микроглиоцитов, на 1 мм² нервной ткани. Измерения проводили по трем полям зрения размером 270 × 203 мкм для каждого случая в каждой изучаемой области (кора, стриатум, белое вещество, субфорникальный орган) с применением программы для морфометрического анализа Fiji (ImageJ). Количество тел клеток считали с использованием плагина «Cell Counter». Площадь, занимаемую микроглиоцитами, оценивали после разделения каналов (DAPI/hematoxylin) с использованием опции «Color Deconvolution» и последующим применением опции «Threshold» и «Measure Particles» [10]. Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software; США). Данные представляли в виде mean ± SEM.

Для сравнения данных использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После постановки иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1 иммунопозитивные клетки были обнаружены во всех изученных областях головного мозга. Продукт реакции был сосредоточен в отростчатых клетках, имеющих типичное для микроглии строение. Было отмечено морфологическое разнообразие Iba1⁺-клеток в зависимости от их локализации в пределах головного мозга. В коре головного мозга животных контрольной группы (WKY) присутствовала типичная

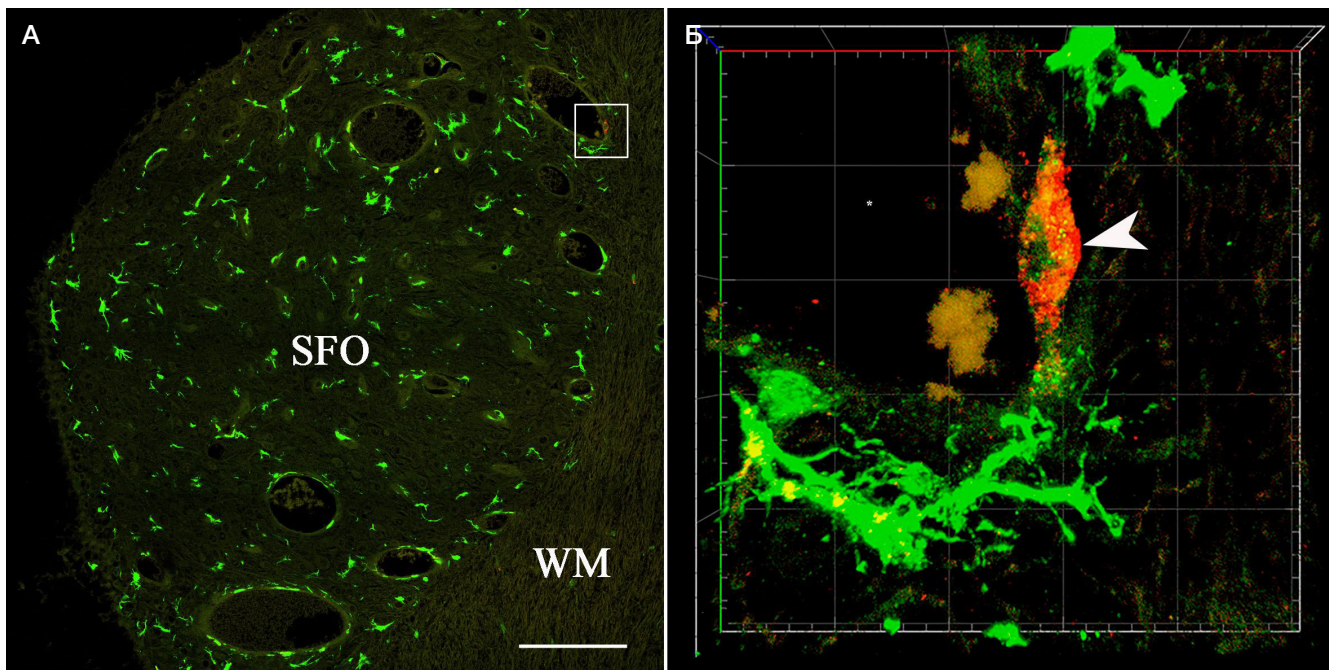


Рис. 2. Субфорникальный орган головного мозга спонтанно гипертензивной крысы линии SHR. Двойная иммунофлуоресцентная реакция на Iba1 (зеленая флуоресценция) и CD68 (красная флуоресценция). Желтый цвет маркирует участки колокализации сигналов зеленого и красного каналов. Рисунок Б является увеличенным фрагментом рисунка А (белая рамка). SFO — субфорникальный орган; WM — белое вещество; звездочка — просвет кровеносного сосуда, головка стрелки указывает на клетку с высоким содержанием CD68. Конфокальная микроскопия. А. Панорамное изображение; масштабный отрезок равен 100 мкм. Б. Трехмерная реконструкция серии оптических срезов, размер ячеек масштабной сетки составляет 10×10 мкм

рамуфицированная микроглия без признаков активации (рис. 1А). Iba⁺-клетки в данном случае характеризовались некрупной сомой и наличием длинных тонких ветвящихся в разных направлениях отростков. Тело клетки часто не попадало в плоскость среза, вследствие чего на некоторых участках коры визуализировались только части отростков микроглиоцитов в виде иммунопозитивных нитей и/или точек. Выявленные иммунопозитивные элементы были равномерно распределены в пределах коры (рис. 1А). В аналогичных участках коры головного мозга спонтанно гипертензивных крыс (SHR) микроглия имела ряд отличий (рис. 1Б). Как и в контроле, иммунопозитивные клетки в данном случае располагались равномерно, не формируя скоплений, однако плотность Iba⁺-элементов визуально была существенно выше. Наблюдалось увеличение размеров тела микроглиальных клеток, а также утолщение их отростков, которые характеризовались интенсивным ветвлением (рис. 1Б). Такие морфологические особенности были характерны для микроглии во всех слоях коры больших полушарий головного мозга спонтанно гипертензивных крыс.

Средняя площадь, занимаемая Iba⁺-микроглией, в коре головного мозга у животных контрольной группы составила $27\,547 \pm 3100$ мкм²/мм², у спонтанно гипертензивных крыс — $18\,790 \pm 2717$ мкм²/мм² ($p = 0,2$). Количество тел Iba⁺-микроглиоцитов у крыс линии WKY было равно $89,56 \pm 10,86$ тел клеток/мм², у крыс линии SHR — $130,1 \pm 19,9$ клеток/мм² ($p = 0,2$).

В стриатуме у контрольных животных, как и в коре головного мозга, была обнаружена типичная рамуфицированная микроглия (рис. 1В). При этом толщина отростков микроглиоцитов была больше в сравнении с корой головного мозга контрольных животных, благодаря чему сложное ветвление отростков у микроглии в этой локализации просматривалось лучше. Как и в коре больших полушарий, в стриатуме микроглия была распределена равномерно, без формирования скоплений.

Тела клеток характеризовались небольшим размером, имели округлую или овальную форму и не всегда попадали в плоскость среза. Микроглия была локализована преимущественно в сером веществе стриатума, в участках белого вещества визуализировались только короткие участки отростков этих клеток (рис. 1В). Средняя площадь Iba⁺-микроглии составила $33\,887 \pm 3944$ мкм²/мм², количество тел Iba⁺-клеток — $111,7 \pm 14,31$ тел клеток/мм². В стриатуме спонтанно гипертензивных крыс форма и характер распределения микроглии не отличались от таковых у контрольных животных, однако было отмечено увеличение размера тел этих клеток и утолщение их отростков, которые при этом характеризовались высокой интенсивностью ветвления (рис. 1Г). Средняя площадь Iba⁺-микроглии в данном случае составила $21\,516 \pm 2589$ мкм²/мм², а количество тел клеток — $146,3 \pm 12,68$ тел клеток/мм², что не имело статистически достоверных различий с контролем ($p = 0,2$).

В субкортикальном белом веществе у контрольных животных присутствовали Iba⁺-клетки веретеновидной формы, тела и отростки которых были ориентированы вдоль нервных волокон (рис. 1Д). Выявленные микроглиоциты характеризовались наличием одного или двух длинных неветвящихся или слабоветвящихся отростков, отходящих от разных полюсов тела клетки в противоположных направлениях (рис. 1Д). У спонтанно гипертензивных крыс в области субкортикального белого вещества наблюдалось увеличение размеров тел и толщины отростков Iba⁺-клеток. Было отмечено присутствие не только веретеновидной микроглии, но и клеток с тремя отростками, отходящими от тела и пронизывающими волокна белого вещества в разных направлениях. При этом усиления интенсивности ветвления отростков показано не было (рис. 1Е). Средняя площадь Iba⁺-микроглии в белом веществе у животных контрольной группы составила $11\,791 \pm 4540$ мкм²/мм², у спонтанно гипертензивных крыс — 9208 ± 1368 мкм²/мм²

($p > 0,9999$). Количество тел Iba1⁺-микроглиоцитов у крыс линии WKY было равно $8107,7 \pm 26,97$ клеток/мм², у крыс линии SHR — $111,7 \pm 2$ клеток/мм² ($p = 0,6$).

В субфорникальном органе животных контрольной группы было отмечено присутствие большого количества Iba1-иммунопозитивных клеток, распределенных относительно равномерно в пределах органа (рис. 1Ж). Морфология микроглии в этой области мозга существенно отличалась от типичной рамифицированной морфологии, характерной для микроглии в норме. Большинство присутствующих в этой локализации Iba1⁺-клеток имели веретеновидную уни- или биполярную форму. Их отростки характеризовались очень слабым ветвлением (частью — его отсутствием) и не имели единого направления. В пределах субфорникального органа встречались также единичные безотростчатые микроглиоциты, характеризующиеся гипертрофией тел и отсутствием выраженных отростков (рис. 1Ж). В субфорникальном органе спонтанно гипертонических крыс все обнаруженные Iba1⁺-клетки были представлены малоотростчатыми формами. Они характеризовались выраженной гипертрофией тел и наличием немногочисленных коротких толстых неветвящихся отростков (рис. 13). Средняя площадь Iba1⁺-микроглии в субфорникальном органе у животных контрольной группы составила $37\ 831 \pm 8283$ мкм²/мм², у спонтанно гипертонических крыс — $45\ 783 \pm 4318$ мкм²/мм² ($p = 0,4$). Количество тел Iba1⁺-микроглиоцитов у крыс линии WKY было равно $337,4 \pm 8,84$ клеток/мм², у крыс линии SHR — $465,4 \pm 27,05$ клеток/мм² ($p = 0,1$).

После постановки двойной иммунофлуоресцентной реакции Iba1/CD68 было отмечено, что во всех исследованных областях головного мозга большинство визуализируемых клеток содержит белок Iba1, равномерно распределенный в телах и отростках (рис. 2; *зеленая флуоресценция*). Морфология этих клеток в каждой исследованной области соответствовала таковой, описанной при постановке иммуногистохимической реакции на белок Iba1 для световой микроскопии. При анализе препаратов на малом увеличении микроскопа создавалось впечатление, что белок CD68 в таких клетках полностью отсутствует. Однако при анализе на большом увеличении CD68 обнаруживались в цитоплазме некоторых клеток в виде локальных скоплений (рис. 2Б; желтый цвет является результатом колокализации зеленого и красного сигналов). Размер, количество и распределение скоплений CD68 в цитоплазме сильно варьировали между отдельными микроглиоцитами, однако какой-либо зависимости этих параметров от локализации клеток обнаружено не было. Также не было отмечено увеличения содержания и/или изменения распределения белка CD68 у спонтанно гипертонических крыс по сравнению с контролем ни в одной из изученных областей головного мозга.

Помимо микроглиоцитов, содержащих большое количество Iba1 и локальные скопления CD68 в цитоплазме, во всех проанализированных областях головного мозга было показано присутствие единичных клеток с высоким содержанием CD68 (рис. 2Б; *голова стрелки*). Белок CD68 выявлялся в цитоплазме этих клеток в виде мелкогранулярных структур, что придавало цитоплазме зернистый вид (рис. 2Б; *красная флуоресценция*). Белок Iba1 в пределах цитоплазмы таких клеток присутствовал в незначительном количестве (в виде точечных включений) или не определялся. Клетки с высоким содержанием CD68 присутствовали в головном мозге и нормотонических, и спонтанно гипертонических животных, и были обнаружены

во всех изученных областях. Они существенно отличались от типичной микроглии по морфологическим характеристикам — имели овальную или вытянутую форму, характеризовались отсутствием ветвящихся отростков и были локализованы преимущественно периваскулярно, редко — в пределах паренхимы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках представленной работы получены морфологические свидетельства хронической активации микроглии в разных отделах головного мозга у крысы на фоне развития АГ. Проведенный статистический анализ позволил выявить тенденцию увеличения количества микроглии в головном мозге у крыс линии SHR по сравнению с животными контрольной группы. Однако продемонстрировать статистически достоверные различия по проанализированным показателям на имеющемся материале не удалось, что может быть связано с недостаточным объемом выборки. Обращает на себя внимание также выраженный разброс показателей среди животных контрольной группы. Это может быть следствием того, что линия WKY, которую широко используют в качестве контроля для линии SHR, имеет ряд особенностей, связанных с состоянием нервной ткани. Так, в недавно проведенных исследованиях нами было отмечено, что в отличие от крыс Wistar, в головном мозге у крыс линий WKY можно наблюдать признаки активации Iba1⁺-клеток Колмера, а в полости мозговых желудочков присутствуют супрапендимные CD68⁺ и Iba1⁺-клетки округлой формы. Это указывает на наличие у крыс линии WKY повреждений гематоликворного барьера и активацию клеток моноцитарно-макрофагального ряда [11]. Вместе с полученными нами в рамках представленной работы данными это ставит под вопрос адекватность использования крыс линии WKY в качестве контроля при проведении нейробиологических исследований.

Ранее сообщалось, что у крыс линии SHR в продолговатом мозге наблюдается умеренное состояние активации микроглии [5]. Было отмечено, что экспрессия генов метаботропного пуринергического рецептора P2Y12 и фракталкинового рецептора CX3CR1 снижена у крыс линии SHR по сравнению с нормотоническими крысами линии WKY, что коррелирует с фенотипическими признаками активации — снижением плотности клеток микроглии в продолговатом мозге и укорочением микроглиальных отростков [5]. Кроме того, в глубоких слоях коры головного мозга у 35-недельных крыс линии SHR была показана гипертрофия микроглии, что указывает на ее активацию [12]. Активация микроглии в этом исследовании была дополнительно подтверждена с использованием метода проточной цитометрии, который показал значительное увеличение экспрессии CD11b в микроглии головного мозга у крыс линии SHR. В дополнение к этим данным, свидетельствующим об активации микроглии в ряде отделов головного мозга у спонтанно гипертонических крыс, нами были получены свидетельства активации микроглии в коре головного мозга, стриатуме, белом веществе и субфорникальном органе крыс линии SHR по сравнению с крысами WKY того же возраста. Интересно, что наиболее выраженные морфологические признаки активации демонстрировали микроглиоциты в пределах субфорникального органа. Ранее нами было отмечено, что в норме микроглия в этой области находится в преактивированном состоянии,

что может быть связано с отсутствием здесь гемато-энцефалического барьера [13]. С позиции этих данных кажется закономерным, что под влиянием дополнительной стимуляции, связанной с состоянием артериальной гипертензии, микроглиоциты субфорникального органа легче переходят в активированное состояние по сравнению с микроглией в других областях мозга, где в норме микроглия представлена неактивной (рамыфицированной) формой.

Вопрос о роли активации микроглии при АГ в зависимости от локализации остается на сегодня открытым. Показано, что направленное «выключение» микроглии приводит к значительному снижению артериального давления и уменьшению нейровоспаления у мышей с экспериментальной гипертензией. И наоборот, адоптивный перенос активированной микроглии предрасполагал реципиентов к гипертензивным стимуляторам. В совокупности эти результаты указывают на то, что микроглия является ключевым клеточным элементом в нейрогенной регуляции гипертонии [14]. Дальнейшие исследования в области изучения вклада микроглии и опосредованного ею нейровоспаления в патогенез АГ могут привести к обнаружению новых молекулярных мишеней для таргетной терапии этого заболевания.

Факт активации микроглии в условиях развития АГ может иметь важное терапевтическое значение. Так, установлено, что хроническая АГ является одним из факторов риска развития болезни Альцгеймера — наиболее распространенного нейродегенеративного заболевания, которое в настоящее время не поддается профилактике или эффективному лечению. Как полагают, нейровоспаление, вызываемое глиальными клетками, может быть одним из возможных механизмов, связывающих гипертензию и повышенный риск развития болезни Альцгеймера [15]. Более того, имеющиеся экспериментальные данные указывают на то, что активацию глии и развитие нейровоспаления можно обратить вспять применением разных классов антигипертензивных препаратов. Эти исследования позволяют предположить, что антигипертензивные средства могут быть эффективны при болезни Альцгеймера не только благодаря их способности влиять на артериальное давление, но и благодаря их противовоспалительному действию [15].

Известно, что активация микроглии сопровождается усилением фагоцитарной активности этих клеток. Фагоцитоз, осуществляемый микроглией, критически важен для нормального функционирования центральной нервной системы на всех этапах ее развития. Во время эмбрионального и раннего постнатального развития микроглия посредством фагоцитоза очищает развивающийся головной мозг от апоптотических нейронов и олигодендроцитов. Во взрослом мозге микроглия осуществляет фагоцитоз фрагментов гибнущих клеток, а также неактивных синапсов, внося вклад в регуляцию синаптической пластичности и поддержание гомеостаза нервной ткани. При старении микроглия фагоцитирует остатки погибающих нейронов и разрушающихся синапсов. Фагоцитарная активность микроглии усиливается при

развитии патологии: при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера или рассеянный склероз, микроглия может осуществлять фагоцитоз не только гибнущих нейронов, но и β -амилоида, а также миелина [16, 17].

Одним из маркерных белков, позволяющих судить о фагоцитарной активности клеток, является трансмембранный белок-рецептор CD68. Он локализован в лизосомных и эндосомных мембранах клеток моноцитарно-макрофагального ряда и микроглии. Количество CD68 сильно возрастает в условиях развития воспаления, поэтому CD68 традиционно считают маркером активированной микроглии [18]. Основываясь на этих сведениях, а также полученных морфологических свидетельствах активации микроглии в разных отделах головного мозга у спонтанно гипертензивных крыс линии SHR, мы предположили увеличение содержания белка CD68 в микроглиоцитах у крыс линии SHR по сравнению с контролем. Неожиданно, мы не выявили такого увеличения ни в одной из исследованных областей мозга. Это свидетельствует о том, что активация микроглии на фоне развития АГ, вероятно, не сопряжена с усилением фагоцитарной активности этих клеток, и возможно несет регуляторный (секреторный) характер.

Интересной находкой в наших исследованиях стало обнаружение популяции CD68-иммунопозитивных клеток с очень низким содержанием белка Iba-1. Ранее об обнаружении Iba1⁺/CD68⁺ клеток в головном мозге у человека сообщали другие авторы [19]. Они отметили, что при поражениях глубоких подкорковых структур мозга происходят увеличение количества микроглии, содержащей CD68, трансформация разветвленной микроглии в амелоидную и потеря ею экспрессии Iba-1. Согласно результатам проведенной количественной оценки, Iba1⁺/CD68⁺ клетки составляют около 32,5% от общего количества микроглии при поражениях глубоких подкорковых структур мозга [19]. Также, было отмечено, что при болезни Альцгеймера развитие деменции положительно коррелирует с уровнем CD68 и отрицательно — с уровнем Iba1, и что разные по экспрессии этих двух белков популяции микроглии могут сосуществовать в головном мозге [20]. Вопрос о том, являются обнаруженные нами и другими авторами Iba1⁺/CD68⁺-клетки микроглиоцитами нового типа или особой популяцией макрофагов, требует дополнительного изучения.

Выводы

При развитии хронической АГ у крыс линии SHR происходит активация микроглии в коре головного мозга, стриатуме, субкортикальном белом веществе и субфорникальном органе. Микроглия субфорникального органа у нормотензивных крыс находится в преактивированном состоянии. Активация микроглии в органе усиливается на фоне развития АГ. Активация микроглии при АГ не сопровождается усилением фагоцитарной активности этих клеток. Микроглия участвует в развитии процесса нейровоспаления при АГ и поэтому может быть потенциальной мишенью для направленной фармакотерапии этого заболевания.

Литература

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control

from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 2021;

- 398 (10304): 957–980. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01330-1.
2. Erina AM, Rotar OP, Solntsev VN, Shalnova SA, Deev AD, Baranova EI, et al. Epidemiology of arterial hypertension in Russian Federation — importance of choice of criteria of diagnosis. *Kardiologiya*. 2019; 59 (6): 5–11. DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2595
 3. Ma J, Li Y, Yang X, Liu K, Zhang X, Zuo X, et al. Signaling pathways in vascular function and hypertension: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8 (1): 168. DOI: 10.1038/s41392-023-01430-7.
 4. Meissner A. Hypertension and the brain: a risk factor for more than heart disease. *Cerebrovasc Dis*. 2016; 42 (3–4): 255–62. DOI: 10.1159/000446082.
 5. Cohen EM, Mohammed S, Kavurma M, Nedoboy PE, Cartland S, Farnham MMJ, Pilowsky PM. Microglia in the RVLM of SHR have reduced P2Y12R and CX3CR1 expression, shorter processes, and lower cell density. *Auton Neurosci*. 2019; 216: 9–16. DOI: 10.1016/j.autneu.2018.12.002.
 6. Doris PA. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol genomics*. 2017; 49 (11): 601–17. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00065.2017.
 7. Pravenec M, Kurtz TW. Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12 (1): 5–9. DOI: 10.1007/s11906-009-0083-9.
 8. Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 528757. DOI: 10.1155/2015/528757.
 9. Korzhhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
 10. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-protocol*. 2019; 9 (24): e3465. DOI: 10.21769/BioProtoc.3465.
 11. Кирик О. В., Коржевский Д. Э. Маркер макрофагов ED1(CD68) в клетках головного мозга крысы. В сборнике: Материалы IV международной научной конференции «Современные проблемы нейробиологии»; 18–20 мая 2023 г.; Ярославль: ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России, 2023; 85 с.
 12. Kaiser D, Weise G, Möller K, Scheibe J, Pösel C, Baasch S, et al. Spontaneous white matter damage, cognitive decline and neuroinflammation in middle-aged hypertensive rats: an animal model of early-stage cerebral small vessel disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 169. DOI: 10.1186/s40478-014-0169-8.
 13. Guselnikova VV, Razenkova VA, Sufieva DA, Korzhhevskii DE. Microglia and putative macrophages of the subfornical organ: structural and functional features. *Bulletin of RSMU*. 2022; (2): 50–7. DOI: 10.24075/brsmu.2022.020.
 14. Shen XZ, Li Y, Li L, Shah KH, Bernstein KE, Lyden P, Shi P. Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertension*. 2015; 66 (2): 309–16. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05333.
 15. Bajwa E, Klegeris A. Neuroinflammation as a mechanism linking hypertension with the increased risk of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*. 2022; 17 (11): 2342–6. DOI: 10.4103/1673-5374.336869.
 16. Galloway DA, Phillips AEM, Owen DRJ, Moore CS. Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. *Front Immunol*. 2019; 10: 790. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00790.
 17. Gabandé-Rodríguez E, Keane L, Capasso M. Microglial phagocytosis in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 2020; 98 (2): 284–98. DOI: 10.1002/jnr.24419.
 18. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci*. 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
 19. Waller R, Baxter L, Fillingham DJ, Coelho S, Pozo JM, Mozumder M, et al. Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS One*. 2019; 14 (1): e0210888. DOI: 10.1371/journal.pone.0210888.
 20. Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C, et al. MRC CFAS. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation*. 2016; 13 (1): 135. DOI: 10.1186/s12974-016-0601-z.

References

1. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *Lancet*. 2021; 398 (10304): 957–980. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)01330-1.
2. Erina AM, Rotar OP, Solntsev VN, Shalnova SA, Deev AD, Baranova EI, et al. Epidemiology of arterial hypertension in Russian Federation — importance of choice of criteria of diagnosis. *Kardiologiya*. 2019; 59 (6): 5–11. DOI: 10.18087/cardio.2019.6.2595
3. Ma J, Li Y, Yang X, Liu K, Zhang X, Zuo X, et al. Signaling pathways in vascular function and hypertension: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023; 8 (1): 168. DOI: 10.1038/s41392-023-01430-7.
4. Meissner A. Hypertension and the brain: a risk factor for more than heart disease. *Cerebrovasc Dis*. 2016; 42 (3–4): 255–62. DOI: 10.1159/000446082.
5. Cohen EM, Mohammed S, Kavurma M, Nedoboy PE, Cartland S, Farnham MMJ, Pilowsky PM. Microglia in the RVLM of SHR have reduced P2Y12R and CX3CR1 expression, shorter processes, and lower cell density. *Auton Neurosci*. 2019; 216: 9–16. DOI: 10.1016/j.autneu.2018.12.002.
6. Doris PA. Genetics of hypertension: an assessment of progress in the spontaneously hypertensive rat. *Physiol genomics*. 2017; 49 (11): 601–17. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00065.2017.
7. Pravenec M, Kurtz TW. Recent advances in genetics of the spontaneously hypertensive rat. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12 (1): 5–9. DOI: 10.1007/s11906-009-0083-9.
8. Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 528757. DOI: 10.1155/2015/528757.
9. Korzhhevskii DE, Sukhorukova EG, Kirik OV, Grigorev IP. Immunohistochemical demonstration of specific antigens in the human brain fixed in zinc-ethanol-formaldehyde. *Eur J Histochem*. 2015; 59 (3): 2530. DOI: 10.4081/ejh.2015.2530.
10. Crowe AR, Yue W. Semi-quantitative Determination of Protein Expression Using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-protocol*. 2019; 9 (24): e3465. DOI: 10.21769/BioProtoc.3465.
11. Kirik OV, Korzhhevskij DEh. Marker makrofagov ED1(CD68) v kletkax golovnogo mozga krysy. V sbornike: Materialy IV mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii «Sovremennye problemy neyrobiologii»; 18-20 maya 2023 g.; Yaroslavl': FGBOU VO YaGMU Minzdrava Rossii, 2023; 85 c. Russian.
12. Kaiser D, Weise G, Möller K, Scheibe J, Pösel C, Baasch S, et al. Spontaneous white matter damage, cognitive decline and neuroinflammation in middle-aged hypertensive rats: an animal model of early-stage cerebral small vessel disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2014; 2: 169. DOI: 10.1186/s40478-014-0169-8.
13. Guselnikova VV, Razenkova VA, Sufieva DA, Korzhhevskii DE. Microglia and putative macrophages of the subfornical organ: structural and functional features. *Bulletin of RSMU*. 2022; (2): 50–7. DOI: 10.24075/brsmu.2022.020.
14. Shen XZ, Li Y, Li L, Shah KH, Bernstein KE, Lyden P, Shi P. Microglia participate in neurogenic regulation of hypertension. *Hypertension*. 2015; 66 (2): 309–16. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05333.
15. Bajwa E, Klegeris A. Neuroinflammation as a mechanism linking hypertension with the increased risk of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*. 2022; 17 (11): 2342–6. DOI: 10.4103/1673-5374.336869.
16. Galloway DA, Phillips AEM, Owen DRJ, Moore CS. Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease. *Front Immunol*. 2019; 10: 790. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00790.

17. Gabandé-Rodríguez E, Keane L, Capasso M. Microglial phagocytosis in aging and Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2020; 98 (2): 284–98. DOI: 10.1002/jnr.24419.
18. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020; 14: 198. DOI: 10.3389/fncel.2020.00198.
19. Waller R, Baxter L, Fillingham DJ, Coelho S, Pozo JM, Mozumder M, et al. Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions. *PLoS One.* 2019; 14 (1): e0210888. DOI: 10.1371/journal.pone.0210888.
20. Minett T, Classey J, Matthews FE, Fahrenhold M, Taga M, Brayne C, et al. MRC CFAS. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *J Neuroinflammation.* 2016; 13 (1): 135. DOI: 10.1186/s12974-016-0601-z.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ПОЛИМЕРНЫХ ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ МЕМБРАН

А. Д. Коняева¹✉, Е. Ю. Варакута¹, А. Е. Лейман¹, Д. О. Рафиев¹, Е. Н. Больбасов², К. С. Станкевич³

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

² Томский политехнический университет, Томск, Россия

³ Государственный университет штата Монтана, Бозмен, Монтана, США

Раневые дефекты слизистой оболочки рта являются распространенной патологией, для лечения которой разрабатывают покровные мембраны. Целью исследования было изучить морфологические особенности регенерации слизистой оболочки рта при применении полимерных пьезоэлектрических мембран. Исследование проведено на 45 крысах Wistar, разделенных на группы: 1) животные с открытым раневым дефектом; 2) животные с раневым дефектом, перекрытым полимерной мембраной с медным напылением; 3) интактные животные. Забор материала для морфометрического исследования проводили на 3-и, 7-е и 12-е сутки. На 3-и сутки в группе 1 удельная площадь грануляционной ткани была в 1,4 раза больше, чем в группе 2 ($p = 0,033$). Эндотелиоциты ее сосудов экспрессировали VEGF в большей степени в группе 2. В группе 2 происходило полное перекрытие дефекта эпителиальным пластом в отличие от группы 1. На 7-е сутки в группе 2 эпителий был в 2 раза толще, чем в группе 1 ($p = 0,019$). Грануляционная ткань замещалась рыхлой волокнистой соединительной тканью. В группе 1 преобладала удельная площадь воспалительной инфильтрации над рыхлой волокнистой соединительной тканью, экспрессия VEGF была ниже, чем в группе 2. На 12-е сутки в группе 2 преобладала рыхлая волокнистая соединительная ткань, экспрессия VEGF не отличалась от группы 3, отмечалось прорастание периферических нервов. В группе 1 удельная площадь плотной волокнистой ткани была в 3,9 раз больше, чем в группе 2 ($p = 0,012$), в эпителии имелись патологические изменения, а экспрессия VEGF была ниже контрольных значений. Таким образом, использование полимерной пьезоэлектрической мембраны благоприятно влияло на восстановление тканей слизистой оболочки полости рта в области раневого дефекта.

Ключевые слова: регенерация, раневой дефект, скаффолды, пьезоэлектрики, слизистая оболочка полости рта, воспаление

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №23-25-00346.

Вклад авторов: А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Е. Н. Больбасов, К. С. Станкевич — концепция и дизайн исследования; А. Д. Коняева, А. Е. Лейман — сбор и обработка материала; А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Д. О. Рафиев — написание текста; А. Д. Коняева, Е. Ю. Варакута, Д. О. Рафиев, Е. Н. Больбасов, К. С. Станкевич — редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Сибирского государственного медицинского университета (№ 7693/1 от 26 августа 2019 г.). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с директивой Европейского Парламента № 2010/63EU от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей» и Хельсинской декларацией.

✉ **Для корреспонденции:** Анастасия Денисовна Коняева
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634034, Россия; asyakonya95@gmail.com

Статья получена: 18.05.2023 **Статья принята к печати:** 02.06.2023 **Опубликована онлайн:** 19.06.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.020

MORPHOLOGICAL PECULIARITIES OF REGENERATION OF ORAL MUCOSA ASSOCIATED WITH USE OF POLYMERIC PIEZOELECTRIC MEMBRANES

Koniaeva AD¹✉, Varakuta EYu¹, Leiman AE¹, Rafiev DO¹, Bolbasov EN², Stankevich KS³

¹ Human anatomy department, General medicine faculty, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia

³ Chemistry and biochemistry faculty, Montana State University, Bozeman, MT, USA

Wound defects of the oral mucosa are a common pathology the treatment of which often involves synthetic membranes. Development of varieties of such membranes is an ongoing process. This study aimed to register morphological features of the oral mucosa regeneration process in the presence of one of the varieties, the polymer piezoelectric membranes. The study involved 45 Wistar rats divided into 3 groups: 1) animals with an open wound defect; 2) animals with a wound defect covered with a copper-coated polymer membrane; 3) intact animals. The samples for morphometric study were collected on the 3rd, 7th and 12th days. On the 3rd day, rats of group 1 had the specific area of granulation tissue 1.4 times greater than that in group 2 ($p = 0.033$). In group 1 rats, endotheliocytes expressed more VEGF than in the animals of group 2. In group 2, the defect was ultimately completely covered with the epithelial layer, which was not the case in group 1. On the 7th day, the epithelium in rats of group 2 was twice as thick as the layer registered in group 1 ($p = 0.019$). Granulation tissue was replaced by loose fibrous connective tissue. In group 1, the specific area of inflammatory infiltration was greater than that of loose fibrous connective tissue, and the VEGF expression level was lower than in group 2. On the 12th day, the predominant tissue in group 2 was the loose fibrous connective tissue, the VEGF expression level equaled that of group 3, and peripheral nerves began to grow. In group 1, the specific area of dense fibrous tissue was 3.9 times greater than that in group 2 ($p = 0.012$), the epithelium had pathological changes and the VEGF expression was below control values. Thus, a polymer piezoelectric membrane had a positive effect on the post-wound restoration of the oral mucosa tissues.

Keywords: regeneration, wound defect, scaffolds, piezoelectrics, oral mucosa, inflammation

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research under research project №23-25-00346.

Author contribution: Koniaeva AD, Varakuta EYu, Bolbasov EN, Stankevich KS — study concept and design; Koniaeva AD, Leiman AE — collection and processing of the material; Koniaeva AD, Varakuta EYu, Rafiev DO — text authoring; Koniaeva AD, Varakuta EYu, Rafiev DO, Bolbasov EN, and Stankevich KS — text editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Siberian State Medical University (Minutes № 7693/1 of August 26, 2019). All manipulations with the animals were done as prescribed by the Directive 2010/63/EU of the European Parliament of September 22, 2010 "On the protection of animals used for scientific purposes", and the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anastasiia D. Koniaeva
Moskovsky Trakt, 2, Tomsk, 634034, Russia; asyakonya95@gmail.com

Received: 18.05.2023 **Accepted:** 02.06.2023 **Published online:** 19.06.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.020

Регенерация раневого дефекта представляет собой сложный процесс взаимодействия между клетками эпителия, трофического аппарата, фибробластического ряда и воспалительной инфильтрации [1]. В ходе заживления происходят стадии воспаления, регенерации, реорганизации, на каждой из которых перечисленные компоненты имеют свои морфологические особенности рубца [2]. Для заживления посредством первичного натяжения необходимо, чтобы стадия воспаления в кратчайшие сроки перешла на стадию регенерации. В то время как для заживления вторичным натяжением, итогом которого является образование рубца, характерно превалирование воспалительной стадии [3].

Современным подходом ведения раневых дефектов слизистой оболочки рта является использование покровных материалов, которые обеспечивают защиту раневой поверхности от повторной травматизации. Поэтому актуальной задачей является поиск новых раневых повязок, которые не только будут защищать раневую дефект, но и, за счет дополнительных свойств, снижать выраженность воспалительных явлений и ускорять регенерацию [4].

Исзуемая полимерная пьезоэлектрическая мембрана была изготовлена в лаборатории гибридных материалов НИ ТПУ. Ее особенностью, помимо пьезоэлектрических свойств, является модификация при помощи ионов меди, которые обладают доказанными противомикробными и противовоспалительными свойствами [5].

Целью данного исследования было изучить морфологические особенности регенерации слизистой оболочки рта в условиях экспериментального раневого дефекта при применении полимерных пьезоэлектрических мембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 45-ти крысах-самцах линии Вистар, выведенных в виварии на базе ЦНИЛ СибГМУ. Животные содержались в стандартных условиях вивария, с ограничением приема пищи в течение суток после операции. Животные были разделены на три группы: экспериментальную группу 1 ($n = 15$), в которой у животных раневой дефект оставляли открытым согласно стандартному ведению раневого процесса в полости рта; экспериментальную группу 2 ($n = 15$), в которой раневой дефект перекрывали полимерной мембраной на основе винилиденфторида с тетрафторэтиленом, модифицированной медью; контрольную группу 3 ($n = 15$), в которой крысы имели интактную слизистую оболочку. Животных содержали в стандартных условиях вивария.

С целью моделирования раневого дефекта слизистой оболочки рта животные были введены в состояние наркоза в ходе внутримышечной инъекции препаратом «Золетил» в дозировке 0,3 мг. После антисептической обработки операционного поля 2%-м раствором хлоргексидина крысам был иссечен лоскут слизистой оболочки в области щеки размером 7×4 мм. Далее животным экспериментальной группы 2 по краям раны атравматичной иглой простыми узловыми швами фиксировали полимерную мембрану.

Выведение животных из эксперимента производили на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования путем введения в состоянии гипоксии в CO_2 -камере. После повторно иссекали слизистую оболочку щеки на месте раневого дефекта.

Приготовление гистологических препаратов осуществляли по общепринятой методике, просматривали их на световом микроскопе Observer D1 (Karl Zeuss; Германия) с использованием камеры для световой микроскопии AxioCam ICc5 (Karl Zeuss; Германия). Для этого после депарафинизации срезы окрашивали гематоксилином-эозином по стандартной методике.

Для иммуногистохимического исследования после приготовления серийных парафиновых срезов толщиной 4–6 мкм была проведена их депарафинизация, затем иммуногистохимическое окрашивание, для которого использовали кроличьи рекомбинантные поликлональные антитела VEGF и S-100 изотипа IgG (Abcam; США). Оценивали интенсивность иммуногистохимической окраски по четырехбалльной шкале: 0 — нет окрашивания, 1 — слабое окрашивание, 2 — умеренное окрашивание, 3 — сильное, 4 — очень сильное окрашивание.

Формула подсчета:

$$\text{Гистохимический индекс (H-score)} = \sum P(i) \times i,$$

где i — интенсивность окрашивания, выраженная в баллах от 0–4, $P(i)$ — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью.

Подсчет проводили в трех когортах по 100 клеток в различных полях зрения (объектив $\times 40$).

Для электронной микроскопии полученный материал помещали в 2,5%-й раствор глутарового альдегида на 0,2 М какодилатном буфере (1 : 9) для фиксации, постфиксировали в 1%-м растворе OsO_4 в холодильнике в течение 4 ч. Производили дегидратацию и заливали в смесь эпон и аралдита М.

Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5 (BROMMA; Швеция), контрастировали уранила ацетатом и цитратом свинца и изучали с помощью электронного микроскопа JEM -1400 CX (JEOL; Япония).

В основе морфометрического анализа лежали классические методы стереометрии. Подсчитывали показатели толщины эпителиального пласта, численной плотности фибробластов, удельной площади рыхлой и плотной волокнистой соединительной ткани, грануляционной ткани, воспалительной инфильтрации, используя программу обработки графических изображений Axio Vision (Karl Zeuss; Германия) и ImageJ, версия 1.52u (National institute of Public health; США).

На ультратонких срезах изучали ультраструктуру клеток эпителиального пласта, трофического аппарата, фибробластического ряда.

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10.0 (IBM; США). Проверку статистических гипотез на характер распределения признака проводили при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. При обработке полученных результатов использовали методы описательной и непараметрической статистики. Исследуемые параметры описывали как медиану и квартили, $M(Q_1; Q_3)$. При сравнении независимых выборок использовали критерий Краскела–Уоллиса с медианным тестом, для парных сравнений — критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 3-и сутки исследования в экспериментальной группе 1 наблюдали краевую эпителизацию раны, в то время как в группе 2 дефект был полностью перекрыт эпителием, в котором обнаруживались акантолитические пузырьки (рис. 1А).

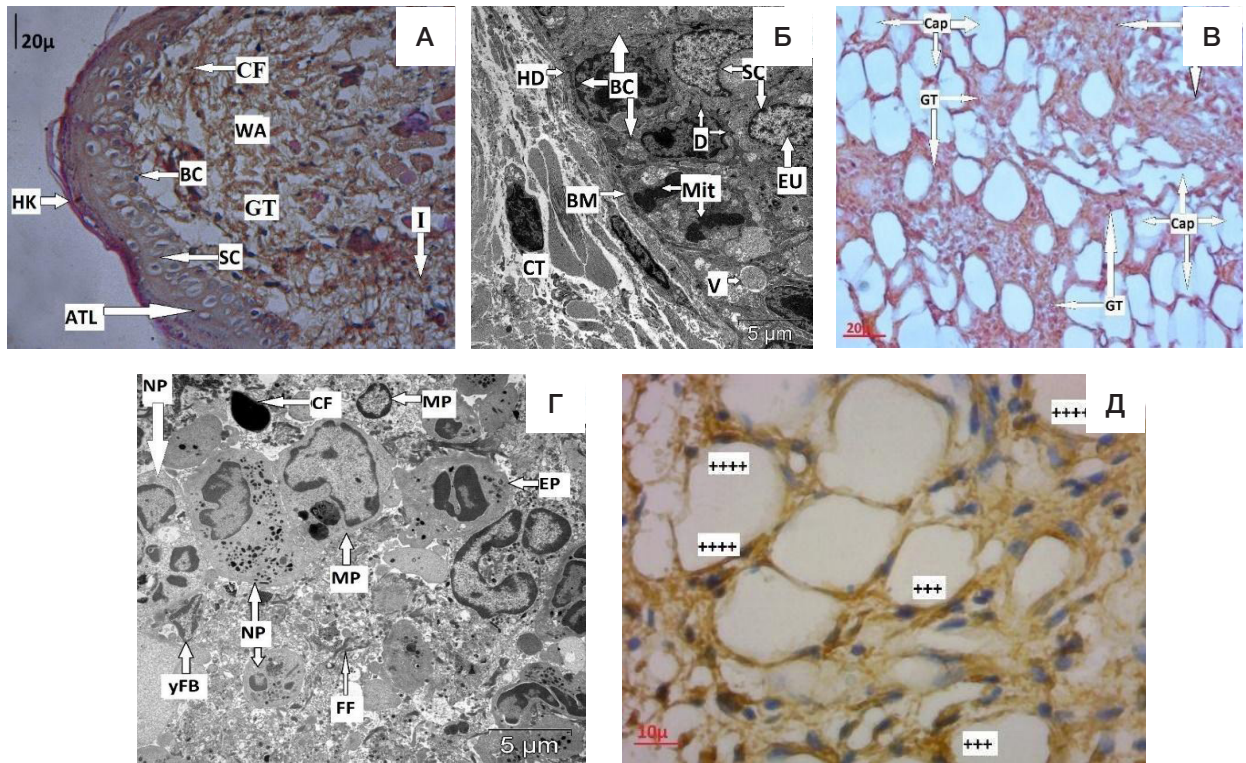


Рис. 1. Слизистая оболочка щеки крысы после нанесения экспериментального раневого дефекта на 3-и сутки исследования. **А.** Новообразованный тонкий эпителиальный пласт в области раневого дефекта и подлежащая грануляционная ткань. Патологические изменения в виде акантолиза. Экспериментальная группа 2; 3-и сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Б.** Клетки базального слоя с признаками высокой пролиферативной активности и фигурами митоза. Экспериментальная группа 2, 3-и сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 5000). **В.** Новообразованные сосуды грануляционной ткани. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. Экспериментальная группа 2, 3-и сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Г.** Клеточная инфильтрация в области раневого дефекта. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. Экспериментальная группа 1, 3-и сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 5000). **Д.** Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. Экспериментальная группа 2, 3-и сутки исследования (увеличение: 900)

На ультраструктурном уровне в обеих экспериментальных группах базальные клетки были вытянуты в ширину, апикально-базальная полярность не определялась. В группе 2 имелись признаки высокой пролиферативной активности, некоторые клетки находились в процессе митоза (рис. 1Б).

Была обнаружена область регенерации, заполненная грануляционной тканью с многочисленными тонкостенными сосудами (рис.1В). Удельная площадь грануляционной ткани в группе с покрытием была в 1,4 раз достоверно больше, чем в группе без него ($p = 0,033$) (см. таблицу). Здоровые ткани отделяла от раневого дефекта зона

Таблица. Морфологические показатели изменений в слизистой оболочке рта при регенерации раневого дефекта, М (Q₁; Q₃)

	Толщина эпителиального пласта, μ	Численная плотность фибробластов, у.е.	Удельная площадь грануляционной ткани, %	Удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани, %	Удельная площадь плотной волокнистой соединительной ткани, %	Удельная площадь воспалительной инфильтрации, %	VEGF
Контроль	203,9 (200,2; 204,4)	380,0 (376,0; 391,7)	-	92,3 (87,2; 95,4)	-	7,7 (5,2; 9,5)	80,0 (75,0; 85,0)
3-и сутки							
Группа 1	-	3782,0* (3721,0; 3849,5)	43,4 (39,4; 47,9)*	-	-	56,6 (50,3; 60,9)*	275,0 (265,0; 290,0)*
Группа 2	20,3 (19,1; 22,1)*	5378,5*# (5346,2; 5465,7)	60,8 (58,5; 62,6)*#	-	-	39,2 (37,3; 41,4)*#	375,0 (370,0; 380,0)*#
7-е сутки							
Группа 1	44,5 (43,2; 6,1)*	4530,5* (4472,5; 4579,7)	38,9 (35,8; 41,8)*	7,8 (6,3; 9,1)*	-	52,8 (49,9; 56,6)*	165,0 (155,0; 175,0)*
Группа 2	87,8 (85,7; 89,5)*#	6136,0*# (6126,0; 6145,0)	41,6 (40,5; 43,5)*	35,1 (33,9; 35,9)*#	-	23,3 (21,9; 24,1)*#	275,0 (362,5; 282,5)*#
12-е сутки							
Группа 1	107,3 (106,2; 69,8)*	2746,5* (2639,0; 2906,0)	-	60,4 (52,5; 73,0)*	23,0 (14,3; 27,8)*	15,4 (11,4; 18,7)*	55,0 (55,0; 60,0)*
Группа 2	184,6 (183,4; 1856,0)#	397,5*# (395,0; 402,0)	-	92,7 (92,5; 93,9)#	5,9 (5,5; 6,3)*#	1,4 (1,2; 1,9)*#	120,0 (125,0; 135,0)*#

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

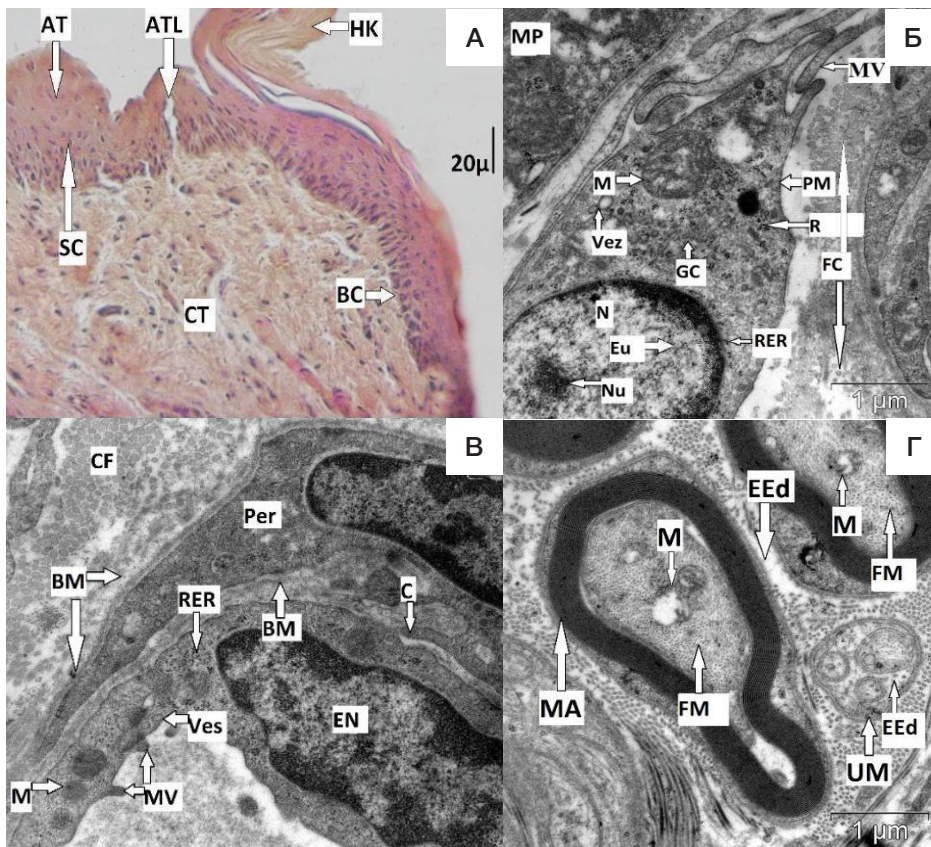


Рис. 2. Слизистая оболочка щеки крысы после нанесения экспериментального раневого дефекта на 7-е сутки исследования. **А.** Патологические изменения эпителия в области регенерирующего раневого дефекта: неравномерная толщина эпителиального пласта, утолщение шиповатого слоя, акантолиз. Экспериментальная группа 1, 7-е сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Б.** Дифференцированный фибробласт, окруженный соединительнотканскими волокнами в области раневого дефекта. Экспериментальная группа 2, 7-е сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 20 000). **В.** Интердигитация между эндотелиоцитом и перицитом капилляра на месте раневого дефекта. Экспериментальная группа 2 (ТЭМ; увеличение: 20 000). **Г.** Периферический нерв, содержащий миелиновые и безмиеиновые волокна с признаками периневрального и эндоневрального отека. Экспериментальная группа 2, 7-е сутки исследования (ТЭМ; увеличение: 20 000)

обширной воспалительной клеточной инфильтрации, удельная площадь которой в группе 2 была в 1,4 раз достоверно меньше, чем в группе 1 ($p = 0,017$). Она состояла из нейтрофилов, макрофагов, плазмоцитов, лимфоцитов и эозинофилов (см. таблицу) (рис. 1Г).

Численная плотность фибробластов в 1 мм² среза была достоверно выше в группе 2 ($p = 0,035$) (см. таблицу). Кроме того, у животных этой группы были выявлены отдельные пучки соединительнотканских волокон (рис. 1А).

В области раневого дефекта обнаружены новообразованные тонкостенные сосуды грануляционной ткани. Их эндотелиоциты активно экспрессировали VEGF (рис. 1Д). При этом подсчитываемый показатель H-score в группе 2 был в 1,4 и 4,7 раз достоверно больше, чем в группе 1 и контрольной группе ($p = 0,029$, $p = 0,019$) (см. таблицу).

Эндотелиальная выстилка и базальная мембрана капилляров грануляционной ткани были тонкими, межэндотелиальные пространства расширенными. Эндотелиоциты бедны органеллами. В группе с покрытием в области люминального края сосудов в эндотелиоцитах визуализировалось большое количество микропиноцитозных пузырьков и многочисленные микроворсинки.

На 7-е сутки исследования во всех экспериментальных группах эпителий полностью перекрывал раневой дефект. В 1-й экспериментальной группе толщина эпителиального пласта была достоверно ниже, чем в интактной слизистой оболочке и во 2-й группе (таблица), были выражены акантолитические процессы (рис. 2А).

В группе 2 патологические изменения эпителия были выражены в меньшей степени, чем в группе без покрытия. Начиная определяться типичный рельеф в виде сосочков в сторону соединительной ткани. Тем не менее, встречались участки с акантозом и акантолизом. Толщина эпителия была в 2,3 раза значимо меньше, чем в контрольной группе ($p = 0,023$), но в 2 раза достоверно больше, чем в группе без покрытия ($p = 0,019$) (см. таблицу). Базальные клетки постепенно приобретали типичную вытянутую в высоту форму и апикально-базальную полярность, восстанавливались контакты с базальной мембраной в виде полудесмосом.

В собственной пластинке слизистой оболочки щеки на месте раневого дефекта во всех экспериментальных группах определялись участки со сформированной рыхлой волокнистой соединительной тканью. Ее удельная площадь в группе 2 была значимо больше в 4,5 раза ($p = 0,041$), чем в группе 1, но в 2,6 раз достоверно меньше, чем в группе контроля ($p = 0,034$).

В группе с покрытием численная плотность фибробластов увеличивалась по сравнению с группой без него в 1,35 раз ($p = 0,041$). В группе с покрытием преобладали крупные дифференцированные фибробласты отростчатой формы с высокой синтетической активностью. Их плазматическая мембрана образовывала многочисленные выросты. В окружении клеток обнаружены пучки соединительнотканских волокон, расположенные в разных плоскостях (рис. 2Б). В группе без покрытия по-прежнему преобладали юные фибробласты, ультраструктура которых

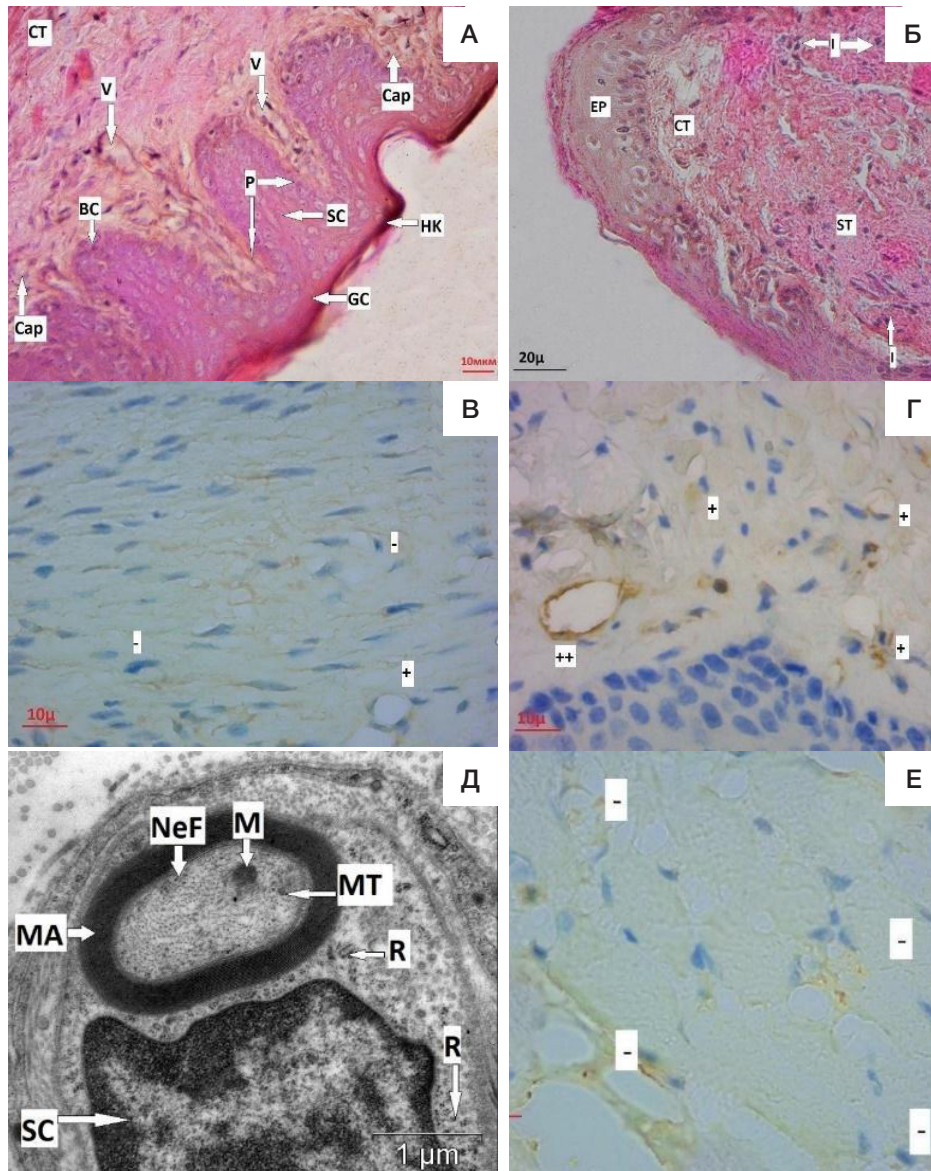


Рис. 3. Слизистая оболочка щеки крысы после нанесения экспериментального раневого дефекта на 12-е сутки исследования. **А.** Восстановленная слизистая оболочка. Экспериментальная группа 2, 12-е сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **Б.** Рубцовые изменения на месте раневого дефекта. Экспериментальная группа 1, 12-е сутки исследования (окраска: гематоксилин, эозин; увеличение: 400). **В, Г.** Экспрессия VEGF в эндотелиоцитах грануляционной ткани, докрасивание ядер гематоксилином. **В.** Экспериментальная группа 1. Экспериментальная группа 2, 12-е сутки исследования (увеличение: 900). **Д.** Периферический нерв, содержащий миелиновые волокна без признаков периневрального и эндоневрального отека в области раневого дефекта. Экспериментальная группа 2 (увеличение: 20 000). **Е.** Отсутствие экспрессии S-100 в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта, докрасивание ядер гематоксилином. Гистологическая картина, характерная для всех экспериментальных групп. Экспериментальная группа 1, 12-е сутки исследования (увеличение: 900). WA — область раневого дефекта; CT — рыхлая волокнистая соединительная ткань; GT — грануляционная ткань; ST — плотная волокнистая соединительная ткань; I — инфильтрация; V — венула; Cap — капилляр; EP — эпителий; BM — базальная мембрана; BC — базальные клетки; SC — шиповатые клетки; GC — клетки поверхностного слоя; HK — роговой слой; ATL — акантолиз; AT — акантоз; P — сосочки; D — десмосомы; HD — полудесмосомы; Va — расширение межклеточного пространства; PM — плазматическая мембрана; EU — эухроматин; N — ядро; Nu — ядрышко; Vez — везикулы; C — межклеточный контакт; Mit — митоз; yFB — молодой фибробласт; MP — макрофаг; NP — нейтрофил; EP — эозинофил; FC — соединительнотканьные волокна; EN — эндотелиоцит; Per — перицит; FF — фрагменты соединительнотканьных волокон; CF — деструктивно измененные клетки; CF — коллагеновые волокна; PN — периферический нерв; MA — миелиновое нервное волокно; UM — безмиелиновое нервное волокно; PEd — отек периневрального пространства; EEd — отек эндоневрального пространства; FM — нейрофиламенты и микротрубочки; +++++ — очень сильное окрашивание; +++ — сильное окрашивание; ++ — умеренное окрашивание; + — слабое окрашивание; — — нет окрашивания

практически не изменилась по сравнению с результатами 3-х суток.

У новообразованных сосудов экспрессия VEGF в группе 2 была в 1,7 и 3,6 раз достоверно больше, чем в группе 1 и в контрольной ($p = 0,022$, $p = 0,015$) (см. таблицу).

В группе 1 на ультраструктурном уровне в эндотелиоцитах по-прежнему встречались признаки нарушения транскапиллярного обмена в отличие от группы 2 (рис. 2В). В группе 2 базальная мембрана сосудов становилась непрерывной, равномерной по толщине.

На границе с раневым дефектом во всех экспериментальных группах выявлены периферические нервы, располагающиеся недалеко от кровеносных сосудов. В отростках нервных клеток определены единичные отечные митохондрии с деструкцией крист. Отмечен отек периневрального и эндоневрального пространства (рис. 2Г).

На 12-е сутки исследования в группе 2 толщина эпителиального пласта восстанавливалась, тогда как в группе 1 она была значимо меньше, чем в интактной

слизистой оболочке (см. таблицу). Патологические процессы в эпителии в группе 2 отсутствовали, подлежащая соединительная ткань вдавалась в эпителий, образуя выраженные сосочки, содержащие сосуды микроциркуляторного русла (рис. 3А). В группе 1 обнаружены явления акантолиза, что на ультраструктурном уровне выражалось в наличии вакуолей в межклеточном пространстве и акантоза в шиповатом слое за счет пролиферации клеток (рис. 3Б).

На 12-е сутки исследования во всех экспериментальных группах исчезла грануляционная ткань, вместо нее появилась молодая рыхлая волокнистая соединительная ткань (рис. 3А). Ее удельная площадь достигала контрольных значений только в группе с покрытием. В группе без покрытия между соединительнотканевыми волокнами обнаружены участки с внутритканевым отеком, встречались очаги с рубцовыми изменениями, основу которых составляла плотная волокнистая соединительная ткань (рис. 3Б). Ее максимальная удельная площадь была зафиксирована в группе, где не использовали раневое покрытие (см. таблицу).

Численная плотность фибробластов в группе с раневым покрытием достигала контрольных значений и была в 6,9 раз достоверно меньше, чем в группе без него ($p = 0,032$). В группе 2 преобладали зрелые функционально неактивные клетки — фиброциты. Экстрацеллюлярный отек вокруг клеток не определялся, зато визуализировались четко организованные коллагеновые волокна. В группе 1 по-прежнему преобладали отростчатые клетки с развитыми органеллами синтеза и дисперсным хроматином.

В группе с покрытием визуализировались зрелые сформированные сосуды микроциркуляторного русла без явлений сладжа, стаза и тромбоза. Сосуды были окружены структурированными волокнами соединительной ткани, периваскулярный отек отсутствовал. Базальная мембрана была непрерывной, равномерной толщины. Органеллы были представлены в достаточном количестве, имели типичную структуру. Активно протекал транскапиллярный обмен. В группе 1 базальная мембрана капилляров была тонкая, у эндотелиоцитов зафиксировано небольшое количество микроворсинок и микропиноцитозных пузырьков, окруженных периваскулярным отеком.

Экспрессия VEGF снижалась по сравнению с 7-ми сутками во всех экспериментальных группах. Индекс H-score VEGF в экспериментальной группе 1 становился в 1,45 раз меньше контрольных значений ($p = 0,026$) (рис. 3В, Г).

Только в группе с раневым покрытием в области раневого дефекта отмечены периферические нервы с безмиелиновыми нервными волокнами (рис. 3Д). Несмотря на это, иммуногистохимическое исследование не выявило экспрессию маркера S-100, что свидетельствовало о начальных стадиях восстановления нервного аппарата (рис. 3Е).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования были показаны основные морфологические аспекты восстановления тканей слизистой оболочки рта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью.

Так, уже на 3-и сутки исследования в группе с раневым покрытием раневой дефект был полностью перекрыт тонким слоем эпителия в отличие от группы без лечения, где наблюдалась краевая эпителизация.

Процесс эпителизации сопровождался изменениями на ультраструктурном уровне, благодаря которым могла происходить миграция эпителиоцитов от краев к центру раны [6]. Сохранение единичных десмосомных контактов наблюдал в своих работах Rorth, который объяснил их наличие необходимостью скоординированной коллективной миграции эпителия [7].

Высокая пролиферативная активность клеток базального слоя обнаружена только в группе с покрытием. В группе без раневого покрытия мы наблюдали отсутствие ультраструктурных признаков высокой пролиферативной активности. Отсутствие признаков высокой пролиферативной активности у клеток базального слоя может быть связано с тем, что мигрирующие клетки не способны делиться до момента полного перекрытия раневого дефекта слоем эпителия из-за снижения содержания циклинов G1/S-фаз и усиления активности циклинзависимой киназы [8].

Первый этап заживления ран протекал с преобладанием воспалительной реакции первые трое суток. Она была направлена на ограничение дефекта, содержащего некротические ткани, микроорганизмы и элементы первичной контаминации от здоровых тканей, удаление этих патологических продуктов, ликвидацию последствий повреждения, а также активацию цитокинов и факторов роста [9]. В связи с этим во всех экспериментальных группах наблюдалось увеличение удельной площади воспалительной инфильтрации.

Параллельно с воспалительной реакцией происходило формирование молодой грануляционной ткани с большим количеством новообразованных сосудов. При этом в группе с раневым покрытием соотношение удельной площади грануляционной ткани и воспалительной инфильтрации смещалось в сторону первого показателя, а в группе без лечения — в сторону второго, что свидетельствовало о преобладании воспалительных процессов над регенераторными.

Развитие грануляционной ткани способствовало отторжению мертвого субстрата, являлось барьером для предотвращения распространения микроорганизмов, а также становилось основой для формирования молодой соединительной ткани на последующих стадиях регенерации раны [10].

Базисным механизмом заживления раны был неангиогенез [11]. Во всех экспериментальных группах происходило активное образование капилляров в грануляционной ткани. Неангиогенез и воспалительная реакция способствовали высвобождению эндотелием и клетками воспалительного инфильтрата проангиогенных молекул — фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и хемокинов, необходимых для обеспечения роста капилляров. Ранее было отмечено, что присутствие VEGF в области регенерирующего раневого дефекта также поддерживало воспалительный ответ и увеличивало проницаемость сосудов, что дополнительно способствовало отеку окружающих тканей [12]. В нашем исследовании экспрессия VEGF увеличивалась во всех экспериментальных группах, особенно с раневым покрытием, что указывало на более интенсивное сосудобразование при отсутствии воздействий со стороны агрессивных факторов ротовой полости.

На 7-й день исследования доминирующим процессом становилась пролиферация, основную роль в которой играли фибробласты, отвечавшие за синтез коллагена и сокращение площади раны [13]. Они секретировали

экстрацеллюлярный матрикс, заменяющий матрикс фибрина [14], в связи с чем происходило усиление их синтетической активности, что обнаруживалось на ультраструктурном уровне в экспериментальной группе 2. Благодаря их присутствию в области раневого дефекта отмечалось значимое увеличение удельной площади рыхлой волокнистой соединительной ткани по сравнению с экспериментальной группой 1, в которой, по данным электронной микроскопии, в основном появлялись юные фибробласты с низкой синтетической активностью.

На 7-е сутки уменьшилась удельная площадь грануляционной ткани, в связи с чем новообразованные сосуды претерпевали изменения на ультраструктурном уровне и по данным иммуногистохимического исследования. Достоверно снижалась экспрессия VEGF для группы 1 по сравнению с группой 2, что стало предпосылкой к дальнейшему недостатку кровоснабжения в области раневого дефекта [15].

Для стадии пролиферации были характерны дифференцировка клеток эпителия и утолщение его слоев. На ультраструктурном уровне в группе 2 восстанавливались апикально-базальная полярность базального слоя, десмосомные контакты между клетками и полудесмосомы с базальной мембраной. Были обнаружены также признаки нарастающей пролиферации. Во всех экспериментальных группах выявлены патологические изменения в виде акантоза и акантолиза, что морфологически проявлялось наличием тканевого детрита в межклеточном пространстве и утолщением шиповатого слоя. Эти патологические признаки были больше выражены в группе без покрытия.

Следующим этапом регенерации раны, наступавшим на 12-е сутки, была рубцовая реорганизация. В группах с покрытием, в отличие от экспериментальной группы 1, преобладала удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани над рубцовой, а также наблюдались преимущественно синтетически не активные фиброциты.

На 12-е сутки происходило уменьшение количества сосудов микроциркуляторного русла во всех экспериментальных группах. Уменьшение количества новообразованных сосудов микроциркуляторного русла связывают с их регрессией в результате избирательного апоптоза на фоне усиления выработки антиангиогенных и снижения проангиогенных факторов, таких как VEGF [12]. В подтверждение этому мы наблюдали, что в экспериментальной группе 1 экспрессия VEGF была значимо ниже, чем в интактной слизистой оболочке. Это свидетельствовало об ухудшении кровоснабжения ткани на месте раневого дефекта, что является одной из основных причин рубцовой деформации [16]. В группе с покрытием экспрессия маркеров сосудодообразования была выше контрольных значений.

На 12-е сутки, по данным электронной микроскопии, в группе с раневым покрытием визуализировались периферические нервы, содержащие безмиелиновые нервные волокна, в группе без него они не определялись. Также в группе 1 по краям от раневого дефекта были

обнаружены периферические нервы с признаками периневрального и эндоневрального отека, в аксонах которых визуализировались митохондрии с деструкцией крист. Исследование экспрессии белка периферических нервов S-100 показывало отрицательные результаты во всех группах, что свидетельствовало о начальных стадиях прорастания нервных волокон в область раневого дефекта.

Полное восстановление толщины и количества слоев эпителия в группе с покрытием происходило благодаря защите его от микроорганизмов. При нарушении целостности эпителиального пласта в случае открытой раны микроорганизмы проникали на дно дефекта, их экзотоксины воздействовали на рану как изнутри, так и снаружи, вызывая апоптоз эпителиоцитов и нарушая их пролиферацию и миграцию, что было связано с феноменом коллективной регуляции экспрессии генов бактерий в биопленке, который повышал их резистентность и способность к колонизации [17]. Кроме того, продукты метаболизма микроорганизмов вызывали в эпителиоцитах усиленную выработку провоспалительных медиаторов через толл-подобные рецепторы [18]. В результате этого мы наблюдали истончение эпителиального пласта и снижение количества его слоев в группе без покрытия, а также сохранение таких патологических изменений, как акантоз и акантолиз.

ВЫВОДЫ

Использование полимерной мембраны способствует полному перекрытию эпителиального пласта уже на 3-и сутки исследования и отсутствию патологических изменений на 12-е сутки. В то время как в группе без нее эпителизация раны наступала только на 7-е сутки, а патологические изменения в виде акантоза и акантолиза визуализировались на 12-е.

При использовании полимерной мембраны происходило более интенсивное замещение грануляционной ткани на рыхлую волокнистую соединительную ткань и наблюдалась меньшая выраженность воспалительной инфильтрации и рубцовых изменений. В то время как в группе без покрытия к моменту окончания исследования преобладала плотная волокнистая соединительная ткань и наблюдалась выраженная воспалительная инфильтрация.

При использовании полимерной мембраны ускорялся неоангиогенез, что выражалось в более интенсивной экспрессии маркера VEGF на каждой точке исследования по сравнению с группой, где покрытие не использовалось.

В целом, исследование показало, что использование полимерной пьезоэлектрической мембраны благоприятно влияло на восстановление тканей слизистой оболочки рта в области раневого дефекта, что сопровождалось ускоренным восстановлением эпителия, трофического аппарата и соединительнотканного компонента. В дальнейшем это способствует оптимизации процесса лечения ран данной локализации и улучшению качества жизни пациентов.

Литература

- Hakkinen L, Koivisto L, Heino J, Larjava H. Cell and molecular biology of wound healing. In: A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, M. Ramalingam, editors. Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York: Elsevier, Academic Press, 2015; p. 669–90.
- Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The role of chemokines in wound healing. Int J Mol Sci. 2018; 19 (10): 3217. DOI: 10.3390/ijms19103217.

3. Ozgok Kangal MK, Regan JP. Wound Healing. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. PMID: 30571027. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535406/>.
4. Zeng Q, Qi X, Shi G, Zhang M, Haick H. Wound dressing: from nanomaterials to diagnostic dressings and healing evaluations. *ACS Nano*. 2022; 16 (2): 1708–33. DOI: 10.1021/acsnano.1c08411.
5. Badaraev A, Koniaeva A, Krikova SA, Shesterikov E, Bolbasov E, Nemoykina AL, et al. Piezoelectric polymer membranes with thin antibacterial coating for the regeneration of oral mucosa. *Applied Surface Science*. 2020; 504: 144068. DOI: 0.1016/j.apsusc.2019.144068.
6. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): The type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. *Cells*. 2021; 10 (7): 1587. DOI: 10.3390/cells10071587.
7. Rørth P. Collective cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. 2009; 25: 407–29. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113231.
8. Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Schliephake H. Salient features of the oral mucosa. In: Hom DB, Hebda PA, Gosain AK, Friedman CD, editors. *Essential tissue healing of the face and neck*. Shelton (CT): People's Medical Publishing House. BC Decker Inc., 2009; p. 83–99.
9. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev*. 2019; 99 (1): 665–706. DOI: 10.1152/physrev.00067.2017.
10. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical researches*. 2009; 37 (5): 1528–42. DOI: 10.1177/147323000903700531.
11. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019; 146: 97–125. DOI: 10.1016/j.addr.2018.09.010.
12. Koniaeva AD, Varakuta EY, Leiman AE, Bolbasov E, Stankevich K. Restoration of the microvasculature and hemodynamics in the oral mucosa wound defects area with and without a piezoelectric polymer membrane. *Clinical and experimental morphology*. 2022; 11: 56–66. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.56-66.
13. Jiang D, Christ S, Correa-Gallegos D, Ramesh P, Kalgudde Gopal S, et al. Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 5653. DOI: 10.1038/s41467-020-19425-1.
14. Rognoni E, Pisco AO, Hiratsuka T, Sipilä KH, Belmonte JM, Mobasser SA, et al. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol Syst Biol*. 2018; 14 (8): e8174. DOI: 10.15252/msb.20178174.
15. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009; 153 (2): 347–58. DOI: 10.1016/j.jss.2008.04.023.
16. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010; 20 (9): 556–67. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.06.006.
17. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The bigger picture: why oral mucosa heals better than skin. *Biomolecules*. 2021; 11 (8): 1165. DOI: 10.3390/biom11081165.
18. Smith P, Martinez C. Wound healing in the oral mucosa. In: Cham LA, editor. *Oral mucosa in health and disease: a concise handbook*. Bergmeier–Switzerland: Springer Int. Publ. AG, 2018; p. 77–91.

References

1. Hakkinen L, Koivisto L, Heino J, Larjava H. Cell and molecular biology of wound Healing. In: A. Vishwakarma, P. Sharpe, S. Shi, M. Ramalingam, editors. *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York: Elsevier, Academic Press, 2015; p. 669–90.
2. Ridiandries A, Tan JTM, Bursill CA. The role of chemokines in wound healing. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (10): 3217. DOI: 10.3390/ijms19103217.
3. Ozgok Kangal MK, Regan JP. Wound Healing. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. PMID: 30571027. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535406/>.
4. Zeng Q, Qi X, Shi G, Zhang M, Haick H. Wound dressing: from nanomaterials to diagnostic dressings and healing evaluations. *ACS Nano*. 2022; 16 (2): 1708–33. DOI: 10.1021/acsnano.1c08411.
5. Badaraev A, Koniaeva A, Krikova SA, Shesterikov E, Bolbasov E, Nemoykina AL, et al. Piezoelectric polymer membranes with thin antibacterial coating for the regeneration of oral mucosa. *Applied Surface Science*. 2020; 504: 144068. DOI: 0.1016/j.apsusc.2019.144068.
6. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): The type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis. *Cells*. 2021; 10 (7): 1587. DOI: 10.3390/cells10071587.
7. Rørth P. Collective cell migration. *Annual review of cell and developmental biology*. 2009; 25: 407–29. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113231.
8. Wehrhan F, Schultze-Mosgau S, Schliephake H. Salient features of the oral mucosa. In: Hom DB, Hebda PA, Gosain AK, Friedman CD, editors. *Essential tissue healing of the face and neck*. Shelton (CT): People's Medical Publishing House. BC Decker Inc., 2009; p. 83–99.
9. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound healing: a cellular perspective. *Physiol Rev*. 2019; 99 (1): 665–706. DOI: 10.1152/physrev.00067.2017.
10. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical researches*. 2009; 37 (5): 1528–42. DOI: 10.1177/147323000903700531.
11. Veith AP, Henderson K, Spencer A, Sligar AD, Baker AB. Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019; 146: 97–125. DOI: 10.1016/j.addr.2018.09.010.
12. Koniaeva AD, Varakuta EY, Leiman AE, Bolbasov E, Stankevich K. Restoration of the microvasculature and hemodynamics in the oral mucosa wound defects area with and without a piezoelectric polymer membrane. *Clinical and experimental morphology*. 2022; 11: 56–66. DOI: 10.31088/CEM2022.11.3.56-66.
13. Jiang D, Christ S, Correa-Gallegos D, Ramesh P, Kalgudde Gopal S, et al. Injury triggers fascia fibroblast collective cell migration to drive scar formation through N-cadherin. *Nat Commun*. 2020; 11 (1): 5653. DOI: 10.1038/s41467-020-19425-1.
14. Rognoni E, Pisco AO, Hiratsuka T, Sipilä KH, Belmonte JM, Mobasser SA, et al. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol Syst Biol*. 2018; 14 (8): e8174. DOI: 10.15252/msb.20178174.
15. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009; 153 (2): 347–58. DOI: 10.1016/j.jss.2008.04.023.
16. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010; 20 (9): 556–67. DOI: 10.1016/j.tcb.2010.06.006.
17. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The bigger picture: why oral mucosa heals better than skin. *Biomolecules*. 2021; 11 (8): 1165. DOI: 10.3390/biom11081165.
18. Smith P, Martinez C. Wound healing in the oral mucosa. In: Cham LA, editor. *Oral mucosa in health and disease: a concise handbook*. Bergmeier–Switzerland: Springer Int. Publ. AG, 2018; p. 77–91.