

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: 0,6

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.2024-01

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 29.02.2024

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: 0.6

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.2024-01

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 29.02.2024

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

4

Молекулярно-цитогенетическая характеристика малых сверхчисленных маркерных хромосом 15 и 22 у асимптоматических носителей
Д. А. Юрченко, Ж. Г. Маркова, М. Е. Миньженкова, Е. О. Воронцова, Н. В. Шилова

Molecular cytogenetic characteristics of small supernumerary marker chromosomes 15 and 22 in asymptomatic carriers
Yurchenko DA, Markova ZhG, Minzhenkova ME, Vorontsova EO, Shilova NV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

11

Мутации 2282del4, R501X, R2447X, S3247X филагрина при атопическом дерматите
Д. А. Вербенко, А. Э. Карамова, В. В. Чикин, И. В. Козлова, К. М. Аулова, А. А. Кубанов, П. В. Гордничев

Filaggrin loss-of-function mutations 2282del4, R501X, R2447X and S3247X in atopic dermatitis
Verbenko DA, Karamova AE, Chikin VV, Kozlova IV, Aulova KM, Kubanov AA, Gorodnichev PV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

19

Определение диагностической значимости маркеров наследственных болезней обмена с применением метода хромато-масс-спектрометрии
И. С. Мамедов, И. В. Золкина, В. С. Сухоруков, А. И. Крапивкин

Determining the diagnostic value of the markers of congenital metabolic disorders by chromatography-mass spectrometry
Mamedov IS, Zolkina IV, Sukhorukov VS, Krapivkin AI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

27

Информативность сенсоров активации сигнальных путей NF-κB и AP-1 при оценке дерматотоксических эффектов *in vitro*
Т. В. Толстова, В. К. Пурецкий, П. М. Кожин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов

Information capacity of the NF-κB and AP-1 signaling activation sensors in *in vitro* assessment of dermatotoxic effects
Tolstova TV, Pureczky VK, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

36

Сравнение липидных изменений в астроцитах по мере роста их злокачественности

С. И. Пеков, К. В. Бочаров, Д. С. Бормотов, В. А. Елиферов, Е. В. Парочкина, А. А. Сорокин, Е. Н. Николаев, И. А. Попов

Comparison of lipid alterations in astrocytomas with increasing grade
Pekov SI, Bocharov KV, Bormotov DS, Eliferov VA, Parochkina EV, Sorokin AA, Nikolaev EN, Popov IA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

41

Влияние пробенецида на активацию астроцитов *in vitro*

И. И. Бабкина, В. В. Мазеева, М. П. Морозова, Л. Р. Горбачева

Effect of probenecid on astrocyte activation *in vitro*
Babkina II, Mazeeva VV, Morozova MP, Gorbacheva LR

МНЕНИЕ

50

Глубокое обучение в моделировании белок-лигандного взаимодействия: новые пути в разработке лекарственных препаратов

А. Д. Барыкин, Т. В. Чепурных, З. М. Осипова

Deep learning in modelling the protein-ligand interaction: new pathways in drug development
Barykin AD, Chepurnykh TV, Osipova ZM

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

55

Новые возможности прогнозирования преэклампсии на основе экспрессии экзосомных белков SUMO

В. А. Гусар, А. В. Тимофеева, И. С. Федоров, А. М. Тарасова, Ю. В. Сухова, Т. Ю. Иванец

Emerging prediction of preeclampsia based on the expression of exosomal SUMO proteins
Gusar VA, Timofeeva AV, Fedorov IS, Tarasova AM, Sukhova YuV, Ivanets TYU

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

68

Особенности микробиоты кишечника у женщин с идиопатическим привычным выкидышем

Л. Н. Гуменюк, М. Д. Бординюгов, Е. В. Сарчук, С. В. Князева, В. А. Заставский, Д. В. Крицкая, Ш. Э. Сайтибрагимова, А. И. Куртвелиева

Specifics of gut microbiota in women with idiopathic recurrent miscarriage
Gumenyuk LN, Bordinyugov MD, Sarchuk EV, Knyazeva SV, Zastavskii VA, Krickaya DV, Saitibragimova SE, Kurtvelieva AI

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

76

Оценка клинической эффективности нового способа адаптивного управления инфузией при фазоэмульсификации

Б. М. Азнабаев, Т. Р. Мухаммадеев, Т. Н. Исмагилов, Т. И. Дибеев

Assessing clinical efficacy of new method for adaptive infusion control in phacoemulsification
Aznabaev BM, Mukhamadeev TR, Ismagilov TN, Dibaev TI

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАЛЫХ СВЕРХЧИСЛЕННЫХ МАРКЕРНЫХ ХРОСОМОВ 15 И 22 У АСИМПТОМАТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ

Д. А. Юрченко , Ж. Г. Маркова, М. Е. Миньженкова, Е. О. Воронцова, Н. В. Шилова

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


Малые сверхчисленные маркерные хромосомы (мСМХ) — структурно аномальные хромосомы, которые невозможно однозначно идентифицировать с использованием методов стандартной цитогенетики. Для более детального анализа морфологии таких хромосом и разработки стратегии медико-генетического консультирования пациентов-носителей мСМХ необходим комплексный подход, включающий молекулярно-цитогенетические методы. Общепринят тот факт, что формирование аномального фенотипа у пациентов с мСМХ в кариотипе связано с наличием материала эухроматиновых районов, вовлеченных в состав маркерной хромосомы. И, как следствие, обусловлено присутствием в геноме протяженных вариаций числа копий участков ДНК (copy number variations, CNV) в виде дупликации, трипликации и большей копийности, которые локализованы в прицентромерном районе соответствующей хромосомы. Прицентромерные CNV могут быть вовлечены в хромосомный дисбаланс и у асимптоматических носителей мСМХ, однако границы такого дисбаланса окончательно не установлены. Целью исследования было получить дополнительные сведения о геномной топографии участков ДНК, не чувствительных к увеличению копийности генов. Был проведен FISH-анализ с коммерческими и несерийными ДНК-зондами у 18 носителей мСМХ 15 и 22 без клинически значимых аномалий фенотипа. Установлено, что в 33% (6 из 18) случаев присутствуют участки прицентромерного эухроматина размером 1,2 м.п.н. и 714 т.п.н. соответственно. Мы предполагаем, что эти регионы не содержат потенциально чувствительных к дозе генов.

Ключевые слова: мСМХ, CNV, прицентромерный эухроматин, FISH, несерийный ДНК-зонд

Финансирование: исследование проведено в рамках темы НИР №122032300370-1 «Изучение структурно-функциональных особенностей и механизмов формирования хромосомных аномалий и геномного дисбаланса».

Вклад авторов: Д. А. Юрченко — дизайн исследования, разработка несерийных ДНК-зондов, проведение FISH-диагностики и интерпретация полученных данных, подготовка рукописи; Ж. Г. Маркова и М. Е. Миньженкова — проведение FISH-исследования с коммерческими ДНК-зондами; Е. О. Воронцова — отработка протокола FISH-исследования с несерийными ДНК-зондами; Н. В. Шилова — концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов, научное редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» (протокол № 4/2 от 19 апреля 2021 г.). Получено добровольное информированное согласие на участие пациентов в научном исследовании.

 **Для корреспонденции:** Дарья Александровна Юрченко
ул. Москворечье, д. 1, г. Москва, 115522, Россия; dashalbv@mail.ru

Статья получена: 23.10.2023 **Статья принята к печати:** 06.01.2024 **Опубликована онлайн:** 31.01.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.001

MOLECULAR CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF SMALL SUPERNUMERARY MARKER CHROMOSOMES 15 AND 22 IN ASYMPTOMATIC CARRIERS

Yurchenko DA , Markova ZhG, Minzhenkova ME, Vorontsova EO, Shilova NV

Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia


Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) are structurally abnormal chromosomes that cannot be identified unambiguously by standard cytogenetic methods. A comprehensive approach involving the use of molecular cytogenetic methods is required for the more thorough morphological assessment of such chromosomes, as well as for the development of strategy for genetic counseling of the patients being the sSMC carriers. It is widely accepted that the development of abnormal phenotype by the patients having sSMC in their karyotype is associated with the presence of euchromatic region material in the marker chromosome. Therefore, it results from the presence of relatively large DNA copy number variations (CNVs) in the form of duplication, triplication, and more increased copy numbers; which are localized in the pericentromeric region of the appropriate chromosome. Pericentromeric CNVs can be involved in the chromosome imbalance in asymptomatic carriers of sSMC as well, however, the boundaries of such imbalance have not been clearly identified. The study was aimed to acquire additional information about the genomic topology of the DNA regions insensitive to the genes copy number increase. FISH analysis with commercial and homemade DNA probes was performed in 18 carriers of sSMC 15 and 22 having no clinically significant phenotypic abnormalities. The molecular cytogenetic testing showed that pericentromeric euchromatic regions sized 1.2 Mb and 714 kb, respectively, were found in 33% of cases (6 out of 18). We assume that these regions comprise no potentially dosage-sensitive genes.

Keywords: sSMC, CNV, pericentromeric euchromatin, FISH, homemade DNA probe

Funding: this work was carried out at the expense of budgetary funds within the framework of research topic № 122032300370-1, "Study of Structural and Functional Features and Mechanisms of the Formation of Chromosomal Abnormalities and Genomic Imbalance."

Author contribution: Yurchenko DA — study design, development of homemade DNA probes, FISH diagnosis and data interpretation, manuscript writing; Markova ZhG and Minzhenkova ME — FISH analysis with commercial DNA probes; Vorontsova EO — implementation of the protocol of FISH with homemade DNA probes; Shilova NV — study concept and design, discussion, scientific editing of manuscript.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Research Centre for Medical Genetics (protocol № 4/2 dated 19 April 2021). The patients submitted the informed consent to participation in scientific research.

 **Correspondence should be addressed:** Darya A. Yurchenko
Moskvorechye, 1, Moscow, 115522, Russia; dashalbv@mail.ru

Received: 23.10.2023 **Accepted:** 06.01.2024 **Published online:** 31.01.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.001

Малые сверхчисленные маркерные хромосомы (мСМХ) представляют собой гетерогенную группу структурно аномальных добавочных хромосом, которые не могут быть однозначно идентифицированы при стандартном цитогенетическом исследовании в силу их малых размеров и особенностей генного состава, а именно присутствия субмикроскопических вариаций числа копий участков ДНК (copy number variations, CNV) [1]. Среди новорожденных доля носителей мСМХ в популяции составляет 0,044% и 70% из них не имеют видимых клинических проявлений [2, 3]. Показано, что мСМХ могут быть производными любой из 24 хромосом человека и иметь разнообразные морфологические формы, такие как инвертированные дупликации (inv dup), кольцевые (r) и минутные (min) хромосомы [4, 5]. Среди людей с кариотипом 47,XN,+mar мСМХ чаще всего представляют собой производные хромосомы 15 (примерно 30%) и хромосомы 22 (примерно 20%) [1]. Клинические проявления, связанные с наличием мСМХ в кариотипе, могут проявляться в широком спектре — от фенотипической нормы до значительных отклонений в физическом и психомоторном развитии — и зависят от хромосом, участвующих в их образовании, наличия эухроматиновых районов, генного состава, уровня мозаицизма и однородительской дисомии.

Фенотипически нормальные носители малых сверхчисленных маркерных хромосом могут иметь CNV в виде дупликации/трипликации, локализованных в прицентромерных эухроматиновых районах [6]. Это позволяет предположить, что такие CNV не содержат дозозависимых генов, поэтому увеличение их копийности не приведет к серьезным изменениям фенотипа. За последние десятилетия накапливается все больше фактов о том, что присутствие в геноме CNV, вовлекающих довольно протяженные, размером до нескольких миллионов пар нуклеотидов (м.п.н.), эухроматиновые районы, не вызывает фенотипических отклонений у их носителей [7].

Таким образом, эухроматиновые мСМХ в кариотипе асимптоматических носителей могут представлять собой идеальную модель для анализа протяженности областей генома человека, не чувствительных к изменению числа копий генов, расположенных в прицентромерных районах. Это позволит более точно определить границы, где заканчиваются дозочувствительные регионы и начинаются участки генома, изменение копийности которых может привести к аномалиям фенотипа и задержке психомоторного развития [8]. Подробное исследование каждого случая мСМХ и накопление дополнительных данных способствуют расширению наших знаний о механизмах образования и патогенетической значимости CNV, связанных с наличием в геноме этих добавочных маркерных хромосом. Целью исследования было получить дополнительные сведения о геномной топографии участков ДНК, не чувствительных к увеличению копийности генов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования были 18 образцов периферической крови асимптоматических носителей мСМХ15 ($n = 9$: трое мужчин, шесть женщин) и мСМХ22 ($n = 9$: пятеро мужчин, четыре женщины). Критерии включения: показанием к кариотипированию было участие всех пациентов в программе вспомогательных репродуктивных технологий.

Цитогенетическое исследование GTG-окрашенных хромосом выполняли по стандартному протоколу [9].

Идентификацию маркерных хромосом проводили методом FISH с коммерческими ДНК-зондами на центромерные (прицентромерные) районы хромосомы 15 (SE 15, Kreatech; Нидерланды) и хромосомы 22 (CCP22-Pericentromeric, CytoTest Inc.; США), а также районы 15q11.2 (LSI SNRPN, Kreatech; Нидерланды) и 22q11.2 (LSI TBX1, Kreatech; Нидерланды) для исключения присутствия клинически значимых эухроматиновых районов в составе маркерной хромосомы. FISH-анализ с коммерческими ДНК-зондами проводили по протоколам фирм-производителей (Kreatech, CytoTest Inc.; США). Денатурацию и гибридизацию проводили с использованием гибридизационной системы ThermoBrite (StatSpin; США). Анализ проводили с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Axiolmager M.1 (Carl Zeiss; Германия) и компьютерной программы обработки цифровых изображений Isis (MetaSystems; Германия)

Основополагающим этапом исследования были разработка собственных (несерийных) ДНК-зондов на прицентромерный эухроматин хромосом 15 и 22 и проведение FISH-анализа для выявления CNV, потенциально не чувствительных к увеличению копийности участков ДНК. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST NCBI [10] и базы данных UCSC Genome Browser [11]. Для проверки специфичности выбранных праймеров использовали программу OligoAnalyzer™ Tool [12]. Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия). Нуклеотидные последовательности подобранных ДНК-праймеров представлены в табл. 1.

Последовательности подобранных ДНК-праймеров были использованы для проведения LR-ПЦР с использованием набора BioMaster LR HS-PCR (2x) («БиолабМикс»; Россия) на амплификаторе GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems; США) в соответствии с протоколом производителя [13]. Полученные ампликоны очищали на колонках с использованием набора diaGene для очистки ДНК из реакционных смесей («Диаэм»; Россия) согласно инструкции производителя, с последующим объединением в одну пробирку очищенных продуктов ПЦР для получения ДНК-зонда размером 10–30 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н). С целью введения флуоресцентной метки в ДНК-зонд использовали метод nick-трансляции [14–16].

Для проведения FISH с несерийными ДНК-зондами использовали отдельную денатурацию ДНК на хромосомном препарате и ДНК-зонда [14, 15, 17].

Для контрокрашивания хромосом использовали DAPI I (Abbott Molecular; США) в растворе Vectashield (Vector Labs; США) в соотношении 1:20. Для анализа изображений метафазных хромосом использовали программу обработки цифровых изображений Isis (MetaSystems; Германия), установленную в комплексе с эпифлуоресцентным микроскопом Axiolmager M.1 (Carl Zeiss; Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При стандартном цитогенетическом исследовании у всех пациентов ($n = 18$) выявлен кариотип с дополнительной маркерной хромосомой — 47,XN,+mar. Во всех случаях отмечали мозаицизм с высоким уровнем аномального клона (более 40%). FISH с коммерческими ДНК-зондами на центромерные районы акроцентрических хромосом позволил в девяти случаях идентифицировать мСМХ как производную хромосомы 15 и в девяти случаях —

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров

Хромосомный регион	Локализация ДНК-зонда относительно центромеры	Последовательности ДНК-праймеров	Длина ПЦР продукта (п.н.)
15q11.2	Проксимальный	F 5'-TACATCTTACACCCACCCACCCAAACC-3' R 5'-TTTGCGGAAGGCATTAGTCCCCTTTGTT-3'	9882
		F 5'-TTAAAACGTGGGCTCTTCATTATCGCCT-3' R 5'-TGGACACCAGACAAAACAAGGAGTCAA-3'	9323
	Дистальный	F 5'-TGACTCCTTTGTTTGTCTGGTGTCCAA-3' R 5'-CTTATCCTTCCACACTCGCTGAGAACAG-3'	9140
		F 5'-CATGGTAATGTTGCGGTGTGTCTTTGTT-3' R 5'-CTATCTTTAGGCTGCTTGTCTGGTGCTT-3'	9676
22q11.2	Проксимальный	F 5'-CCCATATCCTTTCCAAACTCAACACGA-3' R 5'-TTTTCCCTCTGAACCTGGTTTCTGCACT-3'	9441
		F 5'-AGTGCAGAAACCAGTTCAGAGGGAAAAA-3' R 5'-GAACCATCCACGAGGGAGAGTAGTTTTG-3'	9842
		F 5'-TCGCCATGTACTTCACTTTGTTCTGGTT-3' R 5'-GACTGGTCAAGGATGAGGATTTGTCAGG-3'	9600
	Медиальный	F 5'-TCTTCCTTGCTGGAGGTGGGATCTAGT-3' R 5'-GAGGAGGGAGGGTGTGACAAAAGTAA-3'	9531
		F 5'-CAATGTCTAGGGGCAACAGAGGGCAGAT-3' R 5'-AGGGCAGGAAATGTGTTCTGCTCGCTA-3'	9316
	Дистальный	F 5'-AGAGAGAGGAAGGGGTGCGCTCAAAC-3' R 5'-TGTGGGGTGTGGTGCATGGAGTATGG-3'	9718
		F 5'-CAATCCATGCCACAACATACCAGCCAC-3' R 5'-TATCACTGCCACCCATCCCAATTCTG-3'	9862
		F 5'-CAGAAATGGGGATGGGGTGGCAGTGATA-3' R 5'-CAAGAGGCTGGGGCTTCTGCTTAG-3'	9761

как производную хромосомы 22 (рис. 1А). Кроме того, результаты молекулярно-цитогенетического анализа подтвердили отсутствие клинически значимых CNV на малых сверхчисленных маркерных хромосомах во всех наблюдаемых случаях (рис. 1Б).

FISH-анализ для выявления CNV в проксимальных эухроматиновых районах был проведен на хромосомных препаратах из культивированных лимфоцитов всех 18-ти асимптоматических носителей мСМХ — производных хромосом 15 и 22. Для этой цели были разработаны несерийные локус-специфичные ДНК-зонды (hm). В выборе локализации этих ДНК-зондов мы руководствовались сведениями об областях прицентромерного эухроматина на хромосомах 15 и 22, не чувствительных к дозе генов. Для хромосомы 15 она составляет 3 м.п.н. а для

хромосомы 22 — около 100 т.п.н. [7, 18] Таким образом, для хромосомы 15 были разработаны два hm размером порядка 10–30 т. п. н. Ближний по отношению к центромере проксимальный (hm-15-prox) ДНК-зонд расположен на расстоянии 1,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина, в то время как дистальный ДНК-зонд (hm-15-dist) локализован на расстоянии 2,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина хромосомы 15 (рис. 2А). Интервал между двумя ДНК-зондами составил в 1 м.п.н. Для изучения района прицентромерного эухроматина хромосомы 22 были разработаны три несерийных локус-специфичных ДНК-зонда (hm) длиной порядка 30 т.п.н. Ближний по отношению к центромере проксимальный ДНК-зонд (hm-22-proximal) локализован на расстоянии 478 т.п.н. от прицентромерного гетерохроматина,

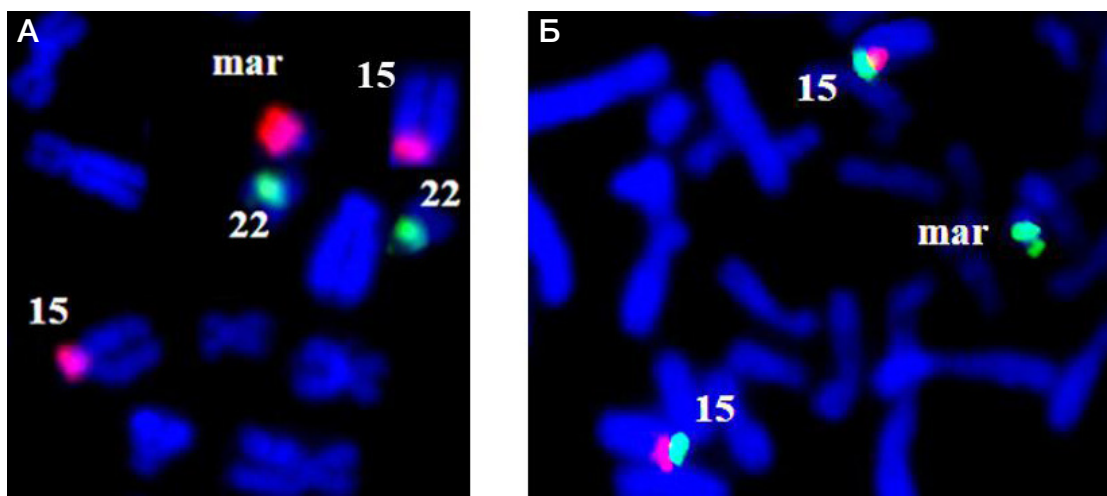


Рис. 1. Результат FISH с коммерческими ДНК-зондами на хромосому 15. А. Маркерная хромосома — производная хромосомы 15 в виде инвертированной дупликации (ish dic(15;15)(D15Z1+,D15Z1+)). Центромера хромосомы 15 (D15Z1) — красный гибридационный сигнал, прицентромерная область хромосомы 22 (CCP22-Pericentromeric) — зеленый гибридационный сигнал (контроль). Б. Маркерная хромосома — производная хромосомы 15 не содержит эухроматиновый район 15q11.2-q13. Центромера хромосомы 15 (D15Z1) — зеленый гибридационный сигнал, LSI SNRPN — красный гибридационный сигнал

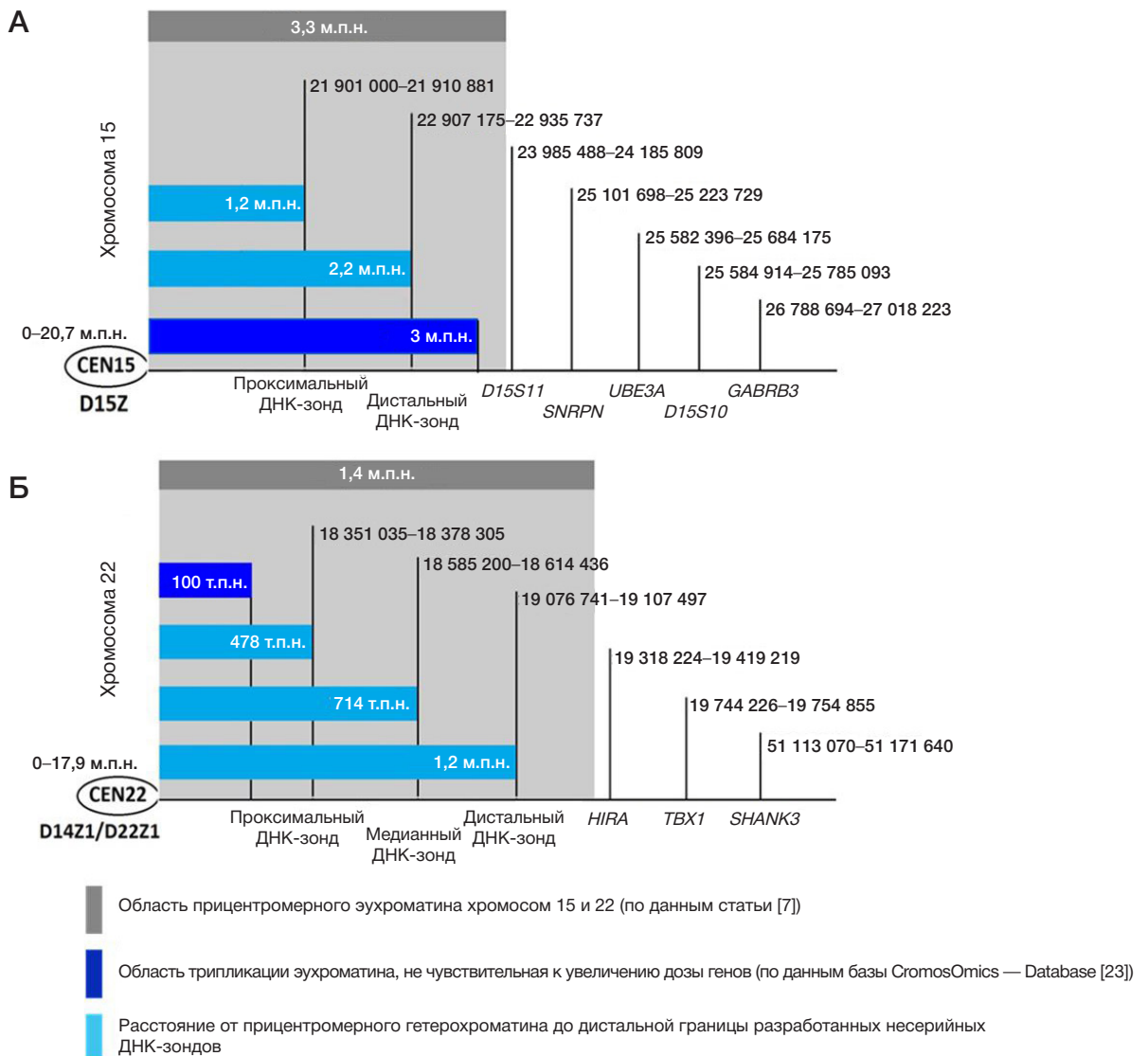


Рис. 2. А. Размер и локализация несерийных (homemade) ДНК-зондов в области прицентромерного эухроматинового района хромосомы 15. **Б.** Размер и локализация несерийных (homemade) ДНК-зондов в области прицентромерного эухроматинового района хромосомы 22

медианный ДНК-зонд (hm-22-median) — на расстоянии 714 т.п.н. от прицентромерного гетерохроматина и дистальный (hm-22-distal) ДНК-зонд, дальний по отношению к центромере, — на расстоянии 1,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина хромосомы 22 (рис. 2Б).

Результат FISH-исследования прицентромерных эухроматиновых районов мСМХ, производных хромосом 15 и 22, с разработанными несерийными ДНК-зондами представлен в табл. 2, во всех случаях было проанализировано 30 метафазных пластинок.

Как видно из табл. 2, у четырех пациентов с мСМХ15 и восьми пациентов с мСМХ22 прицентромерный эухроматин обнаружен не был, т. е. маркерные хромосомы содержали только гетерохроматиновые районы.

У пяти пациентов (№ 3, 6–9, табл. 2) на мСМХ, производной хромосомы 15, выявлен прицентромерный эухроматин, однако детектировался только гибридационный сигнал от проксимального ДНК-зонда, т. е. размер эухроматинового района не превышал 1,2 м.п.н. от прицентромерного гетерохроматина хромосомы 15 (рис. 3).

В одном случае (11 из табл. 2) на мСМХ 22 был выявлен прицентромерный эухроматин при гибридизации с двумя несерийными ДНК-зондами, а именно с проксимальным

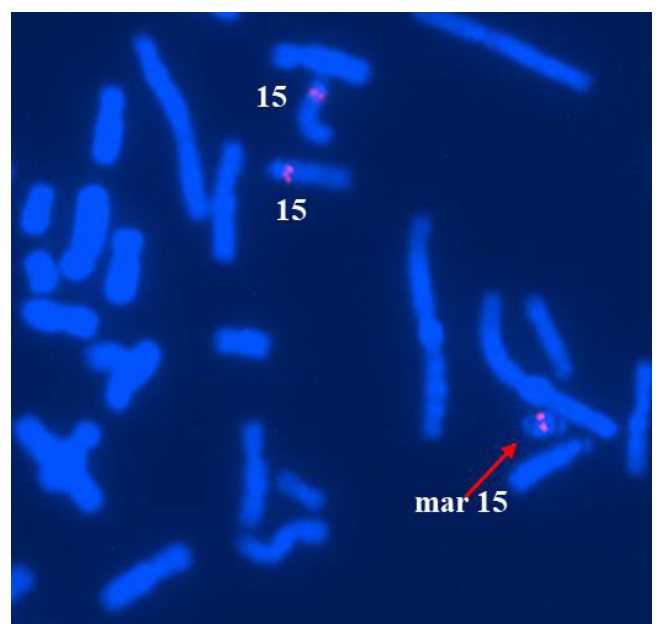


Рис. 3. Результат гибридизации с несерийным ДНК-зондом на прицентромерный эухроматин хромосомы 15 — hm-15-prox

Таблица 2. Молекулярно-цитогенетические характеристики мСМХ

№ п/п	Пол	FISH с коммерческими ДНК-зондами	FISH с несерийными ДНК-зондами (hm)		
			Проксимальный	Медианный	Дистальный
1	М	ish dic(15;15)(D15Z1+,SNRPN-;SNRPN-,D15Z1+)	hm15-	не предусмотрен для мСМХ 15	–
2	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,SNRPN-;SNRPN-,D15Z1+)	hm15-		–
3	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
4	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,SNRPN-;SNRPN-,D15Z1+)	hm15-		–
5	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15-		–
6	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
7	М	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
8	М	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
9	Ж	ish dic(15; 15)(D15Z1+,D15S10-;D15S10-,D15Z1+)	hm15+		hm15-
10	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
11	М	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22++	hm22+	hm22-
12	М	ish r(22)(p13q11.1)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-)	hm22-	–	–
13	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
14	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
15	М	ish i(22)(p10)(D14Z1/D22Z1+,acro-p++)	hm22-	–	–
16	Ж	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
17	М	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–
18	М	ish dic(22; 22)(D14Z1/D22Z1+,TBX1-;TBX1-;D14Z1/D22Z1+)	hm22-	–	–

Примечание: hm (homemade) — несерийный ДНК-зонд.

и медианным, соответственно, размер вовлеченного в хромосомную перестройку дисбаланса составил суммарно 714 т.п.н. (рис. 4).

Таким образом, у носителей мСМХ, производных хромосом 15 и 22, без видимых клинических проявлений в 67% случаев (12/18) маркерные хромосомы содержат только гетерохроматиновые районы, а в 33% случаев определены участки эухроматина в прицентромерных районах длинных плеч хромосом 15 и 22, размером 1,2 м.п.н. (chr15 [hg19]: 20 700 000–21 910 881) и 714 т.п.н. (chr22 [hg19]: 17 900 000–18 614 436) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Малые сверхчисленные маркерные хромосомы представляют собой редкую хромосомную аномалию, поскольку они одновременно являются числовой и структурной перестройкой [18]. Клинические проявления при мСМХ варьируют, но для некоторых описаны синдромные формы — например, синдром кошачьего глаза (MIM#115470), синдром Эмануэль (MIM#609029), синдром Паллистера–Киллиана (MIM#601803) и синдром изохромосомы 18p (MIM#614290) (OMIM — Online Mendelian Inheritance in Man; [19]).

Чаще всего особенности клинической картины в значительной степени объясняются вовлечением эухроматина в хромосомный дисбаланс, а именно с наличием (или отсутствием) чувствительных к дозе генов в прицентромерных эухроматиновых областях. Тем не менее, конкретные гены до сих пор не идентифицированы [7].

С развитием методов молекулярно-цитогенетического исследования появилась возможность определить хромосомное происхождение мСМХ и классифицировать их на основе наличия или отсутствия эухроматиновых районов, что облегчает анализ связи мСМХ с клиническими аномалиями фенотипа [6]. Лабораторные подходы к диагностике и изучению мСМХ широко представлены в

литературе [20–22]. Наиболее часто для идентификации структуры и определения генного состава используют метод флуоресцентной гибридизации *in situ* и хромосомный микроматричный анализ. Из недостатков последнего — трудности в интерпретации точного уровня мозаицизма, что является важным моментом, учитывая высокую частоту мозаичных форм мСМХ [1]. Использование FISH-метода более предпочтительно, но коммерческие ДНК-зонды не всегда покрывают интересующие хромосомные регионы. Таким образом, все большее значение приобретают несерийные ДНК-зонды, разработанные для решения конкретной задачи. В одном из исследований обсуждается возможность применения разработанного авторами набора PeCR-FISH для определения прицентромерного эухроматина в составе мСМХ, и было показано, что локус-специфичные несерийные ДНК-зонды на основе ВАС-клонов могут быть использованы для определения точного размера мСМХ и вовлеченности прицентромерного эухроматина [7]. В представленном исследовании были разработаны собственные несерийные олигонуклеотидные ДНК-зонды на прицентромерный эухроматин хромосом 15 и 22. Результаты FISH-анализа демонстрируют высокое качество гибридизационных сигналов и, как следствие, возможность использования такого подхода для изучения прицентромерного эухроматина у носителей мСМХ.

Полученные нами данные о размере прицентромерного эухроматина у асимптоматических носителей мСМХ 15 и 22 согласуются с известными литературными данными и дополняют их. На сегодняшний день опубликовано довольно много случаев присутствия в кариотипе мСМХ15 у пациентов без видимых аномалий фенотипа, а именно 418 случая, согласно базе данных по маркерным хромосомам (ChromosOmics — Database [23]), и большинство из них имеют в составе только гетерохроматин. Описанные случаи мСМХ с вовлечением эухроматина, не считая пренатальных, немногочисленны

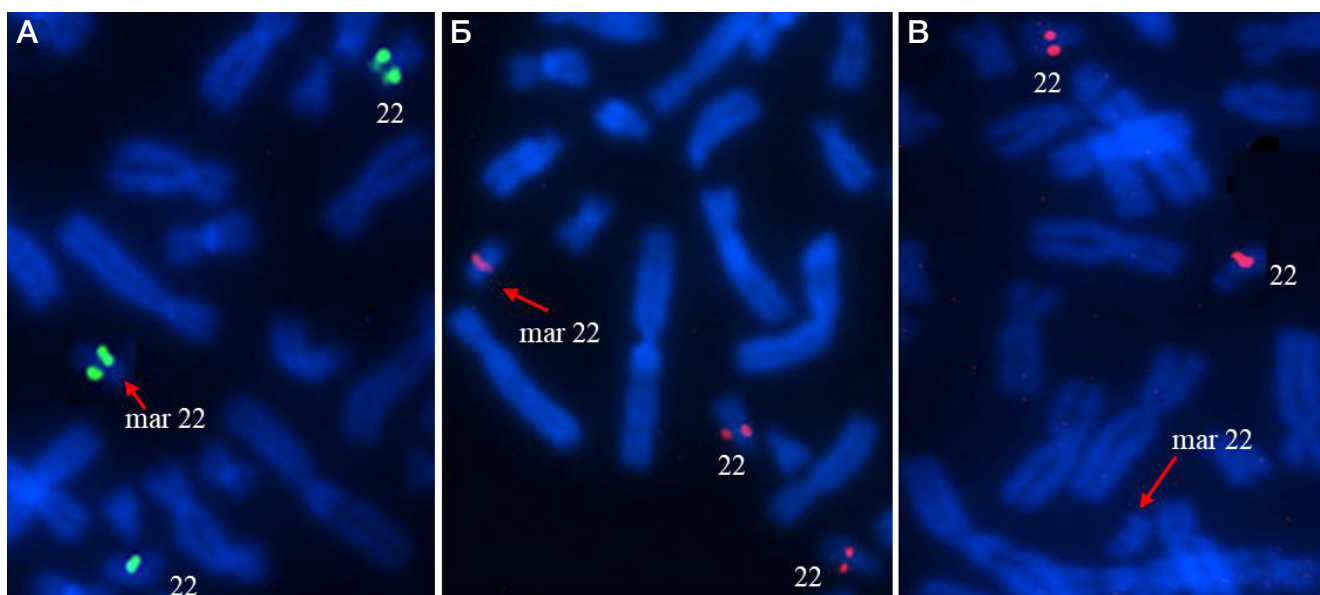


Рис. 4. Результат гибридизации с несерийными ДНК-зондами на прицентромерный эухроматин хромосомы 22. **А.** Проксимальный ДНК-зонд. **Б.** Медианный ДНК-зонд. **В.** Дистальный ДНК-зонд

[18]. Так, например, установлено, что у асимптоматической носительницы мСМХ15 с бесплодием в анамнезе протяженность не чувствительного к дозе генов региона составляет 3,8 м.п.н. (15-O-q11.2/2-6 в вышеуказанной базе данных). Стоит отметить, что у пациентки отмечали высокоуровневый мозаицизм (74% по аномальному клону). Регион проксимального прицентромерного эухроматина, выявленный у пяти асимптоматических носителей мСМХ15 в нашей выборке, оказался менее протяженным (1,2 м.п.н.), чем описанный ранее «некритический» регион, что позволяет существенно дополнить базу данных не чувствительного к дозе генов региона маркерной хромосомы 15.

Количество публикаций по исследованию мСМХ22 у асимптоматических носителей значительно меньше, что коррелирует с частотой встречаемости этой хромосомной аномалии [24]. На сегодняшний день опубликованы данные о 156 таких пациентах (согласно данным сайта), у большинства из которых в состав мСМХ входит только гетерохроматин [23]. Показано, что размер не чувствительного к дозе генов прицентромерного эухроматина хромосомы 22 при трипликации составляет около 100 т.п.н. Однако важно отметить, что описанный случай единичный и представлен детекцией трипликации у плода, т. е. выявлен при пренатальном исследовании, при этом после рождения отмечен нормальный фенотип [7, 18]. В выявленном нами случае размер прицентромерного эухроматина хромосомы

22 у асимптоматического носителя мСМХ22 составил 714 т.п.н., что значительно превышает по размеру описанные данные относительно «некритического» проксимального региона q-плеча хромосомы 22. Полученные новые данные о размере не чувствительного к дозе генов проксимального эухроматина хромосомы 22 могут иметь важное значение для пренатальной диагностики случаев выявления геномного дисбаланса хромосомы 22 (дупликации, трипликации) такого размера при проведении высокопроизводительного секвенирования или хромосомного микроматричного анализа.

ВЫВОДЫ

Проведенные нами исследования указывают на то, что, по-видимому, в прицентромерном эухроматине длинного плеча хромосомы 15 (chr15 (hg19): 20 700 000–21 910 881) и длинного плеча хромосомы 22 (chr22 (hg19): 17 900 000–18 614 436) не присутствуют гены, потенциально чувствительные к увеличению копийности участков ДНК. Геномный дисбаланс, представленный дупликацией/трипликацией этих районов, не приводит к нарушению интеллектуального развития и аномалиям развития. Разработанный подход с использованием несерийных ДНК-зондов демонстрирует высокую чувствительность и специфичность FISH-метода для анализа прицентромерного эухроматина хромосом 15 и 22.

Литература

1. Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 107 (1–2): 55–67. PMID: 15305057.
2. Liehr T, Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med.* 2007; 19 (5): 719–31. PMID: 17390076.
3. Liehr T. Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC). A Guide for Human Geneticists and Clinicians; With contributions by UNIQUE (The Rare Chromosome Disorder Support Group). Heidelberg: Springer, 2012; p. 220.
4. Dalprà L, Giardino D, Finelli P, Corti C, Valtorta C, Ilardi P, et al. Cytogenetic and molecular evaluation of 241 small supernumerary marker chromosomes: cooperative study of 19 Italian laboratories. *Genet Med.* 2005; 7 (9): 620–5. PMID: 16301863.
5. Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMCs): a spotlight on some nomenclature problems. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57 (11): 991–3. PMID: 19654102.
6. Hamid A, Weise A, Voigt M, Bucksch M, Kosyakova N, Liehr T, et al. Clinical impact of proximal autosomal imbalances. *Balkan J Med Genet.* 2012; 15 (2): 15–22. PMID: 24052727.
7. Al-Rikabi ABH, Pekova S, Fan X, Jančušková T, Liehr T. Small

- Supernumerary Marker Chromosome May Provide Information on Dosage-insensitive Pericentric Regions in Human. *Curr Genomics*. 2018; 19 (3): 192–9. PMID: 29606906.
8. Liehr T, Stumm M, Wegner RD, Bhatt S, Hickmann P, Patsalis PC, et al. 10p11.2 to 10q11.2 is a yet unreported region leading to unbalanced chromosomal abnormalities without phenotypic consequences. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 124 (1): 102–5. PMID: 19372675.
 9. Гинтер Е. К. Цитогенетические методы диагностики хромосомных болезней. Методическое пособие для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009; 81 с.
 10. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134. PMID: 22708584.
 11. UCSC Genome Browser. Available from: <http://genome.ucsc.edu>.
 12. OligoAnalyzer™ Tool. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/>.
 13. ООО «БиолабМикс»; Россия. Доступно по ссылке: <http://www.bioblabmix.ru>.
 14. Minzhenkova ME, Yurchenko DA, Semenova NA, Markova ZG, Tarlycheva AA, Shilova NV. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genetics and Molecular Research*. 2022; 21 (4): GMR19065.
 15. Юрченко Д. А., Миньженкова М. Е., Твеленева А. А., Воронцова Е. О., Харченко Т. В., Шилова Н. В. Цитогеномный подход в диагностике инвертированных дупликаций со смежными терминальными делециями. *Медицинская генетика*. 2023; 22 (5): 54–62.
 16. Liehr T. *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*. Berlin: Springer, 2017; p. 606.
 17. Юрченко Д. А. Молекулярно-цитогенетические характеристики и особенности диагностики вариаций числа копий участков ДНК (CNV) [диссертация]. М., 2022.
 18. Liehr T, Williams HE, Ziegler M, Kankel S, Padutsch N, Al-Rikabi A. Small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 14 and/or 22. *Mol Cytogenet*. 2021; 14 (1): 13. PMID: 33632263.
 19. OMIM — Online Mendelian Inheritance in Man. Available from: <https://www.omim.org/>.
 20. Hills LV, Nouri S, Slater HR. Pericentromeric euchromatin is conserved in minute human supernumerary chromosomes: a study using cross-species colour segmenting (RxFISH). *Chromosome Res*. 2003; 11 (4): 359–63. DOI: 10.1023/a:1024096024847.
 21. Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, Klein E, Aust N, et al. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013; 13 (3): 251–5.
 22. Hamid AB, Kreskowski K, Weise A, Kosyakova N, Mrasek K, Voigt M, et al. How to narrow down chromosomal breakpoints in small and large derivative chromosomes — a new probe set. *J. Appl. Genet*. 2012; 53 (3): 259–9.
 23. Chromosomes — Database. Available from: <http://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/15/a-Start.html>.
 24. Tug E, Karaoguz MY, Ergun MA. Prenatal and Postnatal Clinical Spectrum of a Mosaic Small Supernumerary Marker Chromosome 22. *International Journal of Pediatrics and Child Health*. 2019; 7: 36–9.

References

1. Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in humans. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 107 (1–2): 55–67. PMID: 15305057.
2. Liehr T, Weise A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med*. 2007; 19 (5): 719–31. PMID: 17390076.
3. Liehr T. *Small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC). A Guide for Human Geneticists and Clinicians; With contributions by UNIQUE (The Rare Chromosome Disorder Support Group)*. Heidelberg: Springer, 2012; p. 220.
4. Dalprà L, Giardino D, Finelli P, Corti C, Valtorta C, Ilardi P, et al. Cytogenetic and molecular evaluation of 241 small supernumerary marker chromosomes: cooperative study of 19 Italian laboratories. *Genet Med*. 2005; 7 (9): 620–5. PMID: 16301863.
5. Liehr T. Small supernumerary marker chromosomes (sSMCs): a spotlight on some nomenclature problems. *J Histochem Cytochem*. 2009; 57 (11): 991–3. PMID: 19654102.
6. Hamid A, Weise A, Voigt M, Bucksch M, Kosyakova N, Liehr T, et al. Clinical impact of proximal autosomal imbalances. *Balkan J Med Genet*. 2012; 15 (2): 15–22. PMID: 24052727.
7. Al-Rikabi ABH, Pekova S, Fan X, Jančuškova T, Liehr T. Small Supernumerary Marker Chromosome May Provide Information on Dosage-insensitive Pericentric Regions in Human. *Curr Genomics*. 2018; 19 (3): 192–9. PMID: 29606906.
8. Liehr T, Stumm M, Wegner RD, Bhatt S, Hickmann P, Patsalis PC, et al. 10p11.2 to 10q11.2 is a yet unreported region leading to unbalanced chromosomal abnormalities without phenotypic consequences. *Cytogenet Genome Res*. 2009; 124 (1): 102–5. PMID: 19372675.
9. Ginter EK. *Tsitogeneticheskie metody diagnostiki khromosomnykh bolezney. Metodicheskoe posobie dlya vrachey*. М.: GEOTAR-Media, 2009; 81 p. Russian.
10. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134. PMID: 22708584.
11. UCSC Genome Browser. Available from: <http://genome.ucsc.edu>.
12. OligoAnalyzer™ Tool. Available from: <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer/>.
13. ООО «БиолабМикс»; Russia. Available from: <http://www.bioblabmix.ru>. Russian.
14. Minzhenkova ME, Yurchenko DA, Semenova NA, Markova ZG, Tarlycheva AA, Shilova NV. Characterization of a complex chromosomal rearrangement in a girl with PURA syndrome. *Genetics and Molecular Research*. 2022; 21 (4): GMR19065.
15. Yurchenko DA, Minzhenkova ME, Tveleneva AA, Vorontsova EO, Kharchenko TV, Shilova NV. Cytogenomic approach in the diagnostics of inverted duplication/deletion rearrangements. *Medical Genetics*. 2023; 22 (5): 54–62. Russian.
16. Liehr T. *Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*. Berlin: Springer, 2017; p. 606.
17. Yurchenko DA. *Молекулярно-цитогенетические характеристики и особенности диагностики вариаций числа копий участков ДНК (CNV) [диссертация]*. М., 2022. Russian.
18. Liehr T, Williams HE, Ziegler M, Kankel S, Padutsch N, Al-Rikabi A. Small supernumerary marker chromosomes derived from chromosome 14 and/or 22. *Mol Cytogenet*. 2021; 14 (1): 13. PMID: 33632263.
19. OMIM — Online Mendelian Inheritance in Man. Available from: <https://www.omim.org/>.
20. Hills LV, Nouri S, Slater HR. Pericentromeric euchromatin is conserved in minute human supernumerary chromosomes: a study using cross-species colour segmenting (RxFISH). *Chromosome Res*. 2003; 11 (4): 359–63. DOI: 10.1023/a:1024096024847.
21. Liehr T, Weise A, Hamid AB, Fan X, Klein E, Aust N, et al. Multicolor FISH methods in current clinical diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013; 13 (3): 251–5.
22. Hamid AB, Kreskowski K, Weise A, Kosyakova N, Mrasek K, Voigt M, et al. How to narrow down chromosomal breakpoints in small and large derivative chromosomes — a new probe set. *J. Appl. Genet*. 2012; 53 (3): 259–9.
23. Chromosomes — Database. Available from: <http://cs-tl.de/DB/CA/sSMC/15/a-Start.html>.
24. Tug E, Karaoguz MY, Ergun MA. Prenatal and Postnatal Clinical Spectrum of a Mosaic Small Supernumerary Marker Chromosome 22. *International Journal of Pediatrics and Child Health*. 2019; 7: 36–9.

МУТАЦИИ 2282DEL4, R501X, R2447X, S3247X ФИЛАГГРИНА ПРИ АТОПИЧЕСКОМ ДЕРМАТИТЕ

Д. А. Вербенко [✉], А. Э. Карамова, В. В. Чикин, И. В. Козлова, К. М. Аулова, А. А. Кубанов, П. В. Городничев

Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии, Москва, Россия

Атопический дерматит (АтД) — широко распространенное мультифакторное генетически детерминированное воспалительное заболевание кожи, обусловленное среди прочих причин нарушением функций эпидермального барьера. Нулевые мутации гена филаггрина — важного компонента системы натурального увлажняющего фактора, приводящие к отсутствию выработки полноценного белка-предшественника, ассоциированы с АтД. Цель исследования — оценить частоту наиболее распространенных в европейских популяциях нулевых мутаций гена филаггрина 2282delACTG (rs558269137), R501X (rs61816761), S3247X (rs150597413), R2447X (rs138726443) у взрослых пациентов со среднетяжелой и тяжелой степенью АтД. Анализ проведен у 99 взрослых пациентов обоих полов в возрасте 18–68 лет, со среднетяжелым и тяжелым АтД. Идентификацию мутаций осуществляли с помощью разработанного метода мультиплексного анализа четырех однонуклеотидных полиморфизмов при использовании минисеквенирования. Частота встречаемости нулевой мутации филаггрина 2282delACTG оказалась на уровне 5,3%, R501X — на уровне 0,5%, R2447X — на уровне 1%. Нулевая мутация S3247X гена *FLG* в выборке пациентов не обнаружена. Сравнение результатов с российскими и европейскими выборками выявило сопоставимый уровень анализируемых мутаций гена филаггрина у взрослых пациентов с АтД из различных регионов Российской Федерации.

Ключевые слова: атопический дерматит, филаггрин, нулевые мутации, минисеквенирование, однонуклеотидный полиморфизм

Финансирование: исследования выполнены при финансовой поддержке Минздрава РФ (Государственное задание ГНЦДК № 056-00116-21-00-6 на 2021–2023 гг.).

Вклад авторов: А. Э. Карамова, В. В. Чикин, К. М. Аулова, П. В. Городничев — обследование пациентов, постановка диагноза, расчет клинического индекса SCORAD, получение информированного согласия и забор биоматериала пациентов; Д. А. Вербенко — планирование исследования, выполнение молекулярно-генетических экспериментов, написание рукописи; И. В. Козлова — анализ уникальности гибридизующихся к нулевым мутациям олигонуклеотидов в гене *FLG*; А. Э. Карамова — редактирование рукописи; А. А. Кубанов — общее руководство, редактирование рукописи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом при ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» (протокол заседания № 1 от 29 января 2021 г.), соответствует стандартам добросовестной клинической практики и доказательной медицины. Все включенные в исследование пациенты ознакомились и подписали добровольное информированное согласие на участие в его проведении.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Анатольевич Вербенко
ул. Короленко, 3/6, каб. 320, г. Москва, 117076, Россия; verbenko@gmail.com

Статья получена: 12.01.2024 **Статья принята к печати:** 10.02.2024 **Опубликована онлайн:** 25.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.006

FILAGGRIN LOSS-OF-FUNCTION MUTATIONS 2282DEL4, R501X, R2447X AND S3247X IN ATOPIC DERMATITIS

Verbenko DA [✉], Karamova AE, Chikin VV, Kozlova IV, Aulova KM, Kubanov AA, Gorodnichev PV

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Atopic dermatitis (AD) is a widespread multifactorial genetically determined inflammatory skin disease caused by, among other causes, impaired functions of the epidermal barrier. Loss-of-function mutations of the filaggrin gene (important part of the natural moisturizing factor system) that arrest production of the full-fledged precursor protein is associated with AD. This study investigated the frequency of the 2282delACTG (rs558269137), R501X (rs61816761), S3247X (rs150597413), R2447X (rs138726443) loss-of-function mutations of the filaggrin gene in adults of European origin with moderate to severe AD. The study involved 99 adult patients of both sexes aged 18–68 years. The mutations were identified with the help of the purpose-developed method of multiplex analysis of four single nucleotide polymorphisms that relies on the SNaPshot technique (minisequencing). The incidence of loss-of-function mutation of filaggrin 2282delACTG was 5.3%, that of R501X — 0.5%, R2447X — 1%. No S3247X mutation was detected in the sample. Collation of the results with Russian and European samples revealed a comparable level of the analyzed filaggrin gene mutations in adult patients with AD from different regions of the Russian Federation.

Keywords: atopic eczema, filaggrin, loss-of-function mutation, SNaPshot technique, SNP

Funding: the research was financially supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (State Task for the State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology № 056-00116-21-00-6 for 2021-2023).

Author contribution: Karamova AE, Chikin VV, Aulova KM, Gorodnichev PV — examination of patients, diagnosing, SCORAD calculation, obtaining informed consent, sampling patients' biomaterial; Verbenko DA — research planning, molecular genetic experiments, manuscript authoring; Kozlova IV — analysis of uniqueness of the oligonucleotides hybridizing to the loss-of-function mutations in the *FLG* gene; Karamova AE — manuscript editing; Kubanov AA — general guidance, manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology (Minutes #1 of January 29, 2021), and meets the standards of good clinical practice and evidence-based medicine. All patients included in the study have read and signed a voluntary informed consent to participate therein.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry A. Verbenko
Korolenko, 3/6, k. 320, Moscow, 117076, Russia; verbenko@gmail.com

Received: 12.01.2024 **Accepted:** 10.02.2024 **Published online:** 25.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.006

Атопический дерматит (АтД) — мультифакторное генетически детерминированное воспалительное заболевание кожи, характеризующееся зудом, хроническим рецидивирующим течением, возрастными особенностями локализации и морфологии очагов поражения. Это одно из наиболее распространенных заболеваний кожи [1–2]. По данным официального государственного статистического наблюдения, распространенность и заболеваемость АтД всего населения Российской Федерации (РФ) в 2022 г. составила 384,7 и 157,1 случаев на 100 тыс. населения соответственно [3, 4]. В немецкоязычных странах среди пациентов с АтД, обращающихся к врачу-дерматовенерологу, у 25% выявляется АтД средней или тяжелой степени тяжести [5].

К генетическим факторам развития АтД относят наличие мутации гена филаггрина в нарушении функции эпидермального барьера [2]. В патогенезе заболевания важную роль играет наследственная детерминированность, приводящая к нарушению состояния кожного барьера, дефектам иммунной системы (стимуляция Th2-клеток с последующей гиперпродукцией IgE), гиперчувствительности к аллергенам и неспецифическим раздражителям, колонизации патогенными микроорганизмами (*Staphylococcus aureus*, *Malassezia furfur*), а также к дисбалансу вегетативной нервной системы с повышением продукции медиаторов воспаления [1, 6, 7]. Близнецовые и семейные исследования подтверждают влияние наследственных факторов (72–90%) на формирование заболевания. АтД развивается у 80% детей, оба родителя которых страдают этим заболеванием, и более чем у 50% детей в случае, если болен только один родитель, при этом риск развития заболевания увеличивается в 1,5 раза, если больна мать [8]. Таким образом, патогенез заболевания связан с работой генов, кодирующих структурные и функциональные белки эпидермиса, а также генов, связанных с регуляцией иммунного ответа и приобретенного иммунитета [1, 9, 10]. В то же время наличие участков генома, связанных с АтД, по данным полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), объясняют лишь около 15% случаев заболевания, оставшаяся изменчивость (так называемая «отсутствующая наследуемость» сложных заболеваний) может быть обусловлена выраженной гетерогенностью заболевания, кумулятивными эффектами структурных вариаций и вариантов количества копий генома, а также эпигенетическими воздействиями [8–10].

Ген филаггрина *FLG* имеет размер 2 т.п.н. и расположен на 1-й хромосоме в комплексе генов эпидермальной дифференцировки, содержащем 70 генов [1, 11]. Ген состоит из трех экзонов, первые два из которых связаны с регуляцией его экспрессии, а третий содержит от 10 до 13 tandemно расположенных повторяющихся копий филаггрина [12]. Продуктом гена является белок профилаггрин, который экспрессируется в клетках базального слоя эпидермиса и по мере диффузии в верхние слои эпидермиса претерпевает ряд биохимических модификаций, приводящих к образованию мономеров филаггрина, при деградации которого образуются компоненты, входящие в состав натурального увлажняющего фактора [8, 13].

Согласно данным многочисленных исследований, нулевые мутации в гене филаггрина, приводящие к отсутствию выработки белка, являются основным фактором развития АтД [1, 2, 8, 11–18]. Риск развития заболевания у носителей нулевых мутаций гена *FLG* в

3,12 раз выше, а по данным исследований российской популяции, риск может достигать 8,13 раз [19, 20]. Значение нулевых мутаций филаггрина в патогенезе АтД обусловлено нарушением защитной функции кожного барьера, облегченным проникновением через эпидермис факторов внешней среды, инициирующих развитие воспалительной реакции, со среднетяжелым и тяжелым течением болезни.

Показано, что частота таких мутаций повышена у пациентов с АтД, при этом спектр мутаций зависит от этнического происхождения пациентов [15]. В европейских популяциях наиболее распространены нулевые мутации 2282del4, R501X, R2447X, S3247X, в то время как у пациентов азиатского происхождения — мутации с.3321delA, с.6950del8, p.S2706X, p.K4022X, p.E2422X, p.Q2417X, p.S1515X, p.S406X и др. [11–18]. Имеются данные о корреляции частоты нулевых мутаций гена филаггрина с тяжестью АтД [16, 21].

Классическим методом определения нулевых мутаций гена филаггрина является ПЦР локуса, содержащего анализируемый вариант, с последующим рестрикционным анализом продукта ПЦР [22]. Однако подобный метод не исключает смещенной оценки частоты встречаемости мутаций, что в основном связано с нестабильностью работы рестриктаз. Секвенирование третьего экзона гена *FLG* по Сэнгеру затруднено из-за повторяющейся последовательности мономеров филаггрина [8, 11, 13]; вероятно по той же причине применение аллель-специфичной гибридизации и использование гидролизующихся зондов в формате ПЦР в реальном времени [23, 24] хотя и используют для детекции мутаций гена филаггрина, но они не получили широкого распространения в виде коммерческого продукта. Современные разработки позволяют использовать широкомасштабное таргетное секвенирование (NGS) для анализа полного спектра нулевых мутаций гена филаггрина [17]. Выполнение полногеномных исследований требует специального оборудования, а также выборочного значительного размера ввиду малой частоты встречаемости отдельных нулевых мутаций; кроме того, система таргетного секвенирования пока не доступна в нашей стране в виде коммерческого продукта. В то же время исследование спектра наиболее распространенных в европейских популяциях нулевых мутаций гена филаггрина в формате «одной пробирки» может быть проведено практически в любой ПЦР-лаборатории, оборудованной для проведения фрагментного анализа.

Цель исследования — оценка частоты наиболее распространенных в европейских популяциях нулевых мутаций гена филаггрина 2282delACTG (rs558269137), R501X (rs61816761), S3247X (rs150597413), R2447X (rs138726443) у взрослых пациентов со среднетяжелой и тяжелой степенью АтД с применением нового метода анализа, позволяющего выявлять такие мутации в мультиплексном формате с использованием минисеквенирования.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполняли в ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения РФ. Критерии включения в исследование и исключения из него описаны ранее [25].

Среди 99 пациентов с АтД, которым были определены полиморфизмы гена *FLG*, было 50 женщин и 49 мужчин в

Таблица 1. Распределение пациентов с АтД в зависимости от возраста, в котором началось заболевание

Число пациентов		Период грудного возраста — младенческий (от месяца до года)	Ранний детский период (1–3 года)	Дошкольный период (3–7 лет)	Младший и старший школьный период (7–18 лет)	Молодые взрослые (18–44 года)	Всего
		абс.					
	абс.	49	19	20	6	5	99
	%	49,5	19,2	20,2	6,1	5	100

возрасте 18–68 лет. Средний возраст пациентов составил $31,07 \pm 10,53$ года. У всех находившихся под наблюдением пациентов диагноз АтД был установлен ранее. На момент включения в исследование у всех пациентов диагноз АтД был подтвержден как соответствующий диагностическим критериям J. M. Hanifin и G. Rajka [2, 26]. Среди включенных в исследование 96 пациентов были европейского происхождения, трое — азиатского.

Возраст начала болезни у обследованных больных АтД был различен (табл. 1).

Заболевание манифестировало преимущественно в детском возрасте. Чаще всего (49,5% случаев) оно начиналось в младенческом возрасте (до года). В возрасте до 3 лет заболели 68 (68,7%) пациентов. До наступления школьного возраста (до 7 лет) заболевание манифестировало у 88 (88,9%) больных АтД. Тем не менее, 5 (5,0%) пациентов сообщили о начале заболевания во взрослом возрасте.

Аллергический ринит был диагностирован у 17 (17,2%) пациентов, бронхиальная астма — у 15 (15,2%), поллиноз — у 11 (11,1%), аллергический конъюнктивит — у 9 (9,1%).

При анализе семейного анамнеза с учетом кровных родственников в одном поколении, в соседних поколениях и через поколение у 44 (44,4%) пациентов с АтД была выявлена его отягощенность по atopическим и аллергическим заболеваниям. АтД был диагностирован у родственников 40 (40,4%) больных (у 14 пациентов — у отца, у 13 пациентов — у матери, у 6 — у родственников второй линии (бабушка, дедушка), у 6 — у сиблингов, у 7 — у родственников третьей линии (дяди, тети). Бронхиальной астмой страдали родственники 8 (8,1%) больных АтД. Три пациента указали, что бронхиальная астма была диагностирована у их отца, у 2 пациентов — у брата, по одному пациенту среди родственников, болеющих бронхиальной астмой, имели мать, дедушку и бабушку. О поллинозе у родственников сообщили 2 (2,0%) пациента (у одного поллинозом страдал отец, у второго — бабушка). У 2 (2,0%) пациентов родственники страдали аллергическим ринитом (у одного — мать и отец, у другого — отец).

Для определения степени тяжести АтД использовали индекс SCORAD. АтД рассматривали как имеющий среднюю тяжесть в случаях, если значение SCORAD составляло 25–50 баллов, как тяжелый, если значение SCORAD было более 50 баллов [27].

У 64 (64,6%) пациентов был диагностирован АтД средней тяжести, у 35 (35,4%) — тяжелой. Значение индекса SCORAD у больных АтД составило 25,2–77,1 балла, в среднем — $47,20 \pm 12,57$ балла.

Полученные образцы венозной крови пациентов в вакуумных пробирках Vacuette K3 с ЭДТА (Greiner Bio-One; Австрия) в объеме 4–5 мл разделяли на клеточную и плазменную фракции при 3000 г в течение 10 мин в центрифуге «Allegra X-14» (Beckman Coulter; США), после чего хранили при -20°C до момента выделения ДНК.

Геномную ДНК выделяли из клеточной биомассы с использованием набора «QIAamp genomic DNA mini kit» (QIAGEN; Германия) согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту полученной геномной ДНК анализировали на спектрофотометре NanoVue 2000 (GeneralElectric; Франция).

Определение нулевых мутаций гена *FLG* осуществляли последовательным проведением двух этапов ПЦР в мультиплексном формате с промежуточной очисткой и последующим определением однонуклеотидных полиморфизмов после разделения в капилляре генетического анализатора 3130 Genetic Analyzer согласно инструкции производителя набора SNaPshot (Applied Biosystems; США). Выбор последовательностей олигонуклеотидов и гибридационных зондов осуществляли согласно информации портала BLAST (США) [28] с использованием Ugene software v.44.0 (<http://ugene.net/>), синтез выполнен ООО «Синтол» (Россия).

Проведение первого этапа ПЦР осуществляли для четырех участков гена *FLG* с использованием праймеров, нуклеотидная последовательность которых указана в табл. 2, с последующей визуализацией успешного прохождения реакции в системе гель-документации VersaDoc (Bio-Rad; США) при окраске бромистым этидием после проведения разделения фрагментов электрофорезом в 2%-м агарозном геле (буфер ТАЕ, напряжение — 180 В, время — 30 мин). Для определения молекулярного веса амплифицированных фрагментов использовали маркер длин 100–1000 п.н. (Thermo Fisher Scientific; США).

ПЦР проводили в пробирках на 0,1 мл (Biologix; Китай) в объеме 20 мкл, содержащих буфер для ПЦР из набора QUAGEN Multiplex PCR Kit (Германия) 10 мкл, по 5 нМ каждого из праймеров в 1 мкл смеси, от 1 до 100 нМ ДНК, а также деионизированную воду. Амплификацию проводили

Таблица 2. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для мультиплексной ПЦР целевых участков гена *FLG*

Участок генома	Направление праймера	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
2282delACTG	прямой	TGGTAGTCAGGCCACTGACAGTG
	обратный	GGTGACCAGCCTGTCCATGG
R501X	прямой	GACCTATTACCGATTGCTCGTGG
	обратный	GGACGTTCAGGGTCTCCCTCT
S3247X	прямой	ACTGGACCCCAAGTGTCTACT
	обратный	GGTGTCTGGGTCTGCTCCAG
R2447X	прямой	TGGGATGTGGTGTGGCTGTGATGAG
	обратный	CAAGGATCCACCACAAGCAGGCA

Таблица 3. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для проведения второго этапа (гибридизационной ПЦР) при определении нулевых мутаций гена филаггрина 2282delACTG (rs558269137), R501X (rs61816761), S3247X (rs150597413), R2447X (rs138726443)

Анализируемая мутация	Нуклеотидная последовательность гибридирующегося праймера 5'-3'	Размер ампликона	Аллельный вариант дикого типа
2282delACTG (rs558269137)	(CT)22ACCAGCCTGTCCATGGCCTGACACTG	71	A
R501X (rs61816761)	(CT)20CGCTGAATGCCTGGAGCTGTCTC	64	G
S3247X (rs150597413)	(TC)11TGGTGTCTGGAGCCGTGCCTT	44	G
R2447X (rs138726443)	(CT)13CCGTTGAGTGCCTGGAGCTGTCTC	51	G

по программе, включающей плавление ДНК и активацию Taq полимеразы в течение 15 мин при температуре 95 °С, и последующими 40 циклами, включающими отжиг праймеров при 57 °С в течение минуты, элонгацию при 72 °С в течение минуты, а также плавление при 95 °С в течение 30 с. Очистку продуктов ПЦР по окончании реакции производили инкубированием при 37 °С в течение 45 мин в присутствии ферментов экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы: к 5 мкл продукта ПЦР добавляли 0,5 мкл ExoI и 1 мкл FastUP (Thermo Fisher Scientific; США), с инактивацией ферментов в течение 15 мин при 85 °С.

Очищенные продукты первого этапа ПЦР использовали для проведения гибридизационной ПЦР с олигонуклеотидами, фланкирующими однонуклеотидные полиморфизмы, последовательности которых представлены в табл. 3. Реакцию осуществляли в пробирках объемом 0,1 мл (Biologix; Китай) в объеме 10 мкл, содержащем 5 мкл готовой смеси 2× SNaPshot PCR ready Master Mix, 3 мкл воды, 1 мкл смешанных очищенных продуктов ПЦР и 1 мкл смеси праймеров. Амплификацию проводили по программе, включающей 25 циклов: отжиг праймеров при 50 °С в течение 5 с, элонгацию при 60 °С в течение 30 с, а также плавление при 95 °С в течение 10 с. Очистку продуктов ПЦР по окончании реакции производили инкубированием при 37 °С в течение 45 мин в присутствии щелочной фосфатазы: к 5 мкл продукта ПЦР добавляли 1 мкл фермента FastUP (Thermo Fisher Scientific; США), с инактивацией в течение 15 мин при 85 °С.

К 0,5 мкл очищенного продукта второго этапа ПЦР добавляли 9 мкл деионизированного формамида, маркер молекулярного веса Gene Mapper LIZ-120 (Applied Biosystems; США) и проводили денатурацию полученной смеси при 95 °С в течение 5 мин с последующим охлаждением на льду.

Разделение смеси продуктов второго этапа мультиплексной ПЦР производили в генетическом анализаторе ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems; США) согласно протоколу работы с набором SNaPshot. Разделение проводили в стандартном капилляре длиной 50 см, заполненным полимером POP-7. Время введения образца составило 7 с. Полученные хроматограммы визуализировали при помощи программного обеспечения Peak Scanner Software 2 (Applied Biosystems; США). Расшифровку производили по сопоставлению времени удержания амплифицированных фрагментов с маркером молекулярного веса Gene Mapper LIZ-120. Производитель набора SNaPshot (Applied Biosystems; США) предоставляет также возможность автоматической расшифровки однонуклеотидных полиморфизмов при использовании соответствующего программного обеспечения (Gene Mapper Software). Сопоставление полученных данных с аллельными вариантами дикого типа при визуализации электрофореграмм позволило определить наличие нулевых мутаций гена филаггрина при обнаружении отклонений от аллелей дикого типа.

Для подтверждения достоверности результатов выявления нулевой мутации 2282delACTG методом минисеквенирования проводили рестрикционный анализ амплифицированного фрагмента гена филаггрина (табл. 1) с использованием рестриктазы Ade I (Dra III) («СибЭнзим»; Россия) согласно методике, опубликованной ранее [22]. При наличии делеции 2282delACTG образуется сайт узнавания рестриктазы Dra III, что визуализируется в виде двух полос после разделения продуктов гидролиза в агарозном геле.

ПЦР проводили с использованием прибора T100 (Bio-Rad; США) в 96-луночных планшетах (Applied Biosystems; США). Реакцию осуществляли в 10 мкл смеси, включающей 0,1 мкМ каждого праймера в объеме 1 мкл, 5 мкл реакционной смеси для ПЦР из коммерчески доступного набора Multiplex PCR mix (QIAGEN; Германия), а также деионизированную воду и матрицу ДНК. Программа амплификации включала плавление ДНК и активацию полимеразы в течение 15 мин и последующими 40 циклами, состоящими из отжига праймеров при 54 °С в течение 30 с, элонгацию в течение 30 с и плавление смеси при 95 °С в течение 15 с.

Гидролиз фрагмента ПЦР проводили с использованием прибора T100 (Bio-Rad; США) в 96-луночных планшетах (Applied Biosystems; США) в течение 3 ч при 37 °С в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 5 ед. эндонуклеазы рестрикции, 2 мкл рестрикционного буфера, 10 мкл продукта ПЦР и деионизированную воду. Обнаружение сайтов рестрикции проводили после разделения в 2%-м агарозном геле при 180 В в камере (Bio-Rad; США) в течение 30 мин визуализацией окрашенных бромистым этидием фрагментов в УФ-свете с использованием трансиллюминатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки частоты нулевых мутаций гена филаггрина 2282delACTG (rs558269137), R501X (rs61816761), S3247X (rs150597413), R2447X (rs138726443) у взрослых пациентов со среднетяжелым и тяжелым АД нами разработан метод анализа, заключающийся в определении однонуклеотидных полиморфизмов, однозначно определяющих наличие вышеупомянутых нулевых мутаций гена *FLG*. Метод позволяет проводить одновременное определение четырех нулевых мутаций гена филаггрина и основан на двух последовательных ПЦР: продуктом первой реакции является область расположения конкретной нулевой мутации, продуктом второй — однонуклеотидное удлинение гибридирующегося праймера специальным набором, позволяющим определить аллельные варианты однонуклеотидного полиморфизма. Одновременное определение четырех исследуемых однонуклеотидных полиморфизмов возможно после разделения в капилляре генетического анализатора 3130 Genetic Analyser согласно инструкции производителя набора SNaPshot (Applied Biosystems; США), причем выводы о наличии нулевых

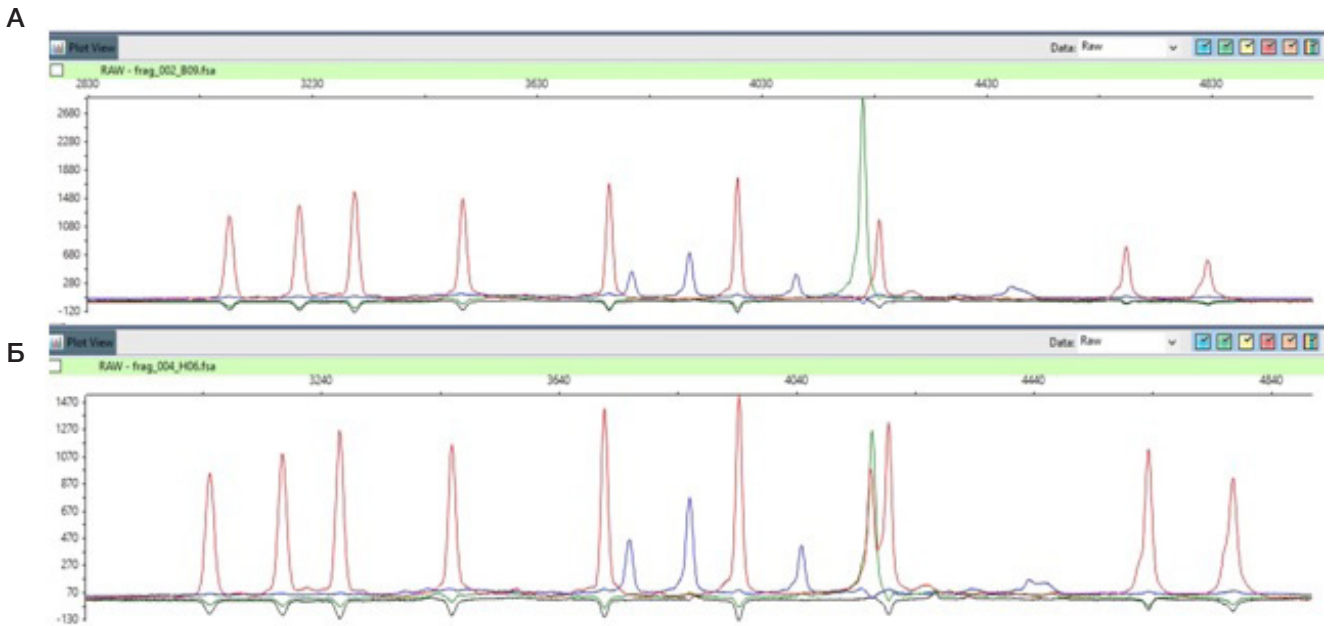


Рис. Электрофореграмма определения четырех однонуклеотидных полиморфизмов нулевых мутаций гена филаггрина методом минисеквенирования. Цвет пика позволяет определить аллельный вариант, размер пика (время удержания) определяет конкретный полиморфизм. Слева направо: S3247X (rs150597413), R2447X (rs138726443), R501X (rs61816761), 2282delACTG (rs558269137). **А.** Все аллельные варианты дикого типа, нулевых мутаций не обнаружены. **Б.** Пример гетерозиготы по мутации 2282delACTG

мутаций гена филаггрина можно сделать при наличии аллелей, отличающихся от вариантов дикого типа. Пример анализа четырех нулевых мутаций гена филаггрина представлен на рисунке.

Разработанный метод определения нулевых мутаций верифицировали с помощью классического рестрикционного анализа в отношении нулевой мутации в экзоне 3 гена филаггрина 2282delACTG. При анализе встречаемости выявлено наличие таких мутаций с частотой 5,2%, что сопоставимо с данными, полученными ранее при проведении определения методом минисеквенирования. Таким образом, данные о наличии нулевых мутаций гена филаггрина, полученные с использованием разработанной системы анализа методом минисеквенирования могут быть использованы для оценки их распространенности, в том числе у пациентов с АтД.

Исследование выборки взрослых пациентов со среднетяжелым и тяжелым АтД проведено для 99 человек. Общая частота встречаемости нулевых мутаций гена филаггрина 2282delACTG, R501X, S3247X, R2447X у взрослых пациентов со среднетяжелым и тяжелым АтД составила 6,8%. Частота встречаемости конкретных нулевых мутаций оказалась следующей: 2282delACTG — 5,05%,

R501X — 0,5%, R2447X — 1%, мутаций S3247X в выборке не обнаружено (табл. 4). Наличие нулевой мутации в виде делеции 4 п.о. в гетерозиготном состоянии 2282delACTG выявлено у 4% пациентов, в гомозиготном — у одного пациента (1%), а также в виде замены R501X у одного пациента в виде компаунд-гетерозиготы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Распространенность изученных четырех мутаций в популяциях условно здорового населения, представленных в консорциуме «1000 геномов», находится на уровне менее 1% [36]. При анализе данных выявлено незначительное превышение интегральной частоты нулевых мутаций гена филаггрина 6,8% у взрослых пациентов с АтД в сравнении с нормальной вариабельностью. Встречаемость нулевых мутаций гена филаггрина R501X, S3247X и R2447X в нашем исследовании пациентов с АтД оказалась на уровне популяционной вариабельности условно здоровых лиц. Таким образом, из четырех исследованных нулевых мутаций гена филаггрина лишь одна 2282delACTG оказалась взаимосвязана с возникновением и развитием АтД у взрослых пациентов из РФ.

Таблица 4. Частота встречаемости нулевых мутаций гена филаггрина 2282delACTG, R501X, S3247X, R2447X у пациентов с АтД в российских и европейских популяциях

	Размер выборки	2282delACTG	R501X	S3247X	R2447X	Источник
Пациенты со среднетяжелым и тяжелым АтД	99	5,05	0,5	0	1	
Жители Новосибирска	470	6,7	1,2	–	–	[29]
Русские центрального региона России	474	2,9	0,9	–	–	[30]
Русские Башкортостана	177	6,03	–	–	–	[31]
Татары	126	9,35	–	–	–	[31]
Австрийцы и немцы	462	14,7	6,5	3	1,7	[32]
Немцы	476	10,9	5,7	–	–	[33]
Итальянцы	178	0,9	0,6	–	–	[34]
Финны	501	3,4	0,9	1,3	–	[35]

Сравнение полученных результатов с данными о распространенности нулевых мутаций гена филаггрина у взрослых пациентов с АтД из российских и европейских популяций (табл. 4) позволило выявить незначительные колебания частоты встречаемости мутации 2282delACTG у пациентов с АтД из различных регионов РФ. Вариации частот, обусловленные по всей вероятности различиями генофонда, сложившимися в ходе эволюционного формирования популяций, составили не более чем двукратную величину. Частота мутации 2282delACTG у взрослых пациентов с АтД из европейских популяций варьирует в более широких пределах, причем наиболее близкая к выявленной в нашем исследовании величина обнаружена в исследованиях пациентов с атопическим дерматитом из Финляндии. Полученные нами данные сопоставимы с результатами других исследований нулевых мутаций гена филаггрина у взрослых пациентов с АтД из российских популяций.

Интегральная частота четырех нулевых мутаций гена филаггрина 6,8%, по результатам нашего исследования, оказалась значительно ниже, чем у детей с тяжелой формой АтД, составляющей 32,8% в российской популяции [21] и 42% у европейских пациентов с ранним дебютом АтД [11]. Исследователи отчасти объясняют это тем, что у носителей нулевых мутаций филаггрина снижен возраст дебюта заболевания (отношение шансов в группе до 20 лет — 8,9; в группе до 5 лет — 7,8) [37]. Детализация классификации типов АтД, основанная на особенностях

путей иммунного развития заболевания (Th2/ретиноловый, связанный с клетками памяти, расположенными в коже (skin homing), Th1/Th2/Th17/IL1 и Th1/IL1 с влиянием эозинофилов), также может служить объяснением различий частоты встречаемости нулевых мутаций гена филаггрина у пациентов разных возрастных групп [38, 39]. Степень тяжести заболевания и патогенез АтД взрослых ассоциированы только с путем skin homing, что согласуется с данными о распространенности АтД у 20% детей и 2–8% взрослых [40].

Выводы

Разработан метод одновременного определения четырех наиболее распространенных в европейских популяциях нулевых мутаций гена филаггрина с использованием минисеквенирования. Исследование выборки больных среднетяжелым и тяжелым АтД выявило частоту встречаемости нулевой мутации филаггрина 2282delACTG на уровне 5,05%, R501X — на уровне 0,5%, R2447X — на уровне 1%. Нулевая мутация S3247X гена FLG в выборке пациентов не обнаружена. Выявленный уровень нулевых мутаций гена филаггрина сопоставим с данными других исследований у взрослых пациентов из РФ с атопическим дерматитом. Полученные данные позволяют предположить наличие незначительного вклада наиболее распространенных в европейских популяциях нулевых мутаций гена филаггрина в развитие АтД.

Литература

1. Заславский Д. В., Свитич О. А., Кудрявцева А. В. Атопический дерматит. Междисциплинарный подход к диагностике и лечению: Руководство для врачей. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024; 288 с.
2. Клинические рекомендации. Атопический дерматит. Утверждены Минздравом РФ. Доступно по ссылке: https://www.nrcii.ru/specialistam/clinrecommend/atopic_dermatitis_2020.pdf
3. Кубанов А. А., Богданова Е. В. Ресурсы и результаты деятельности медицинских организаций, оказывающих медицинскую помощь по профилю «дерматовенерология», в Российской Федерации в 2016–2022 гг. Вестник дерматологии и венерологии. 2023; 99 (4): 18–40. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.25208/vdv12385>.
4. Котова Е. Г., Кобякова О. С., Кубанов А. А., Стародубов В. И., Александрова Г. А., Богданова Е. В., и др. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными болезнями и болезнями кожи в 2022 году: статистические материалы. М.: ФГБУ «ЦНИИОИЗ» Минздрава России, 2023; 209 с. DOI: 10.21045/978-5-94116-130-0-2023.
5. Traidl S, Freimooser S, Werfel T. Janus kinase inhibitors for the therapy of atopic dermatitis. *Allergol Select.* 2021; 5: 293–304. DOI: 10.5414/ALX02272E.
6. Gelezhe KA, Kudravtseva AV, Ryzhii E, Khachatryan LG, Bogdanova EA, Svitich OA. The role of the skin microbiome in the development of allergic inflammation in atopic dermatitis. *New Armenian Medical Journal.* 2021; 15 (1): 100–8.
7. Горский В. С., Блюмина В. А. Современные представления о патогенезе атопического дерматита. *Иммунопатология, аллергология, инфектология.* 2022; 3: 70–76. DOI: 10.14427/jipai.2022.3.70.
8. Беляева Т. М., Пономаренко И. В., Чурносов М. И. Молекулярно-генетические детерминанты атопического дерматита (данные полногеномных исследований). *Клиническая дерматология и венерология.* 2020; 19 (5): 615–21. DOI: 10.17116/klinderma202019051615.
9. Свитич О. А., Олисова О. Ю., Меремьянина Е. А., Рассказова Н. Д., Фомина В. А., Потапова М. Б. Роль полиморфных маркеров в генах TLR2, TLR4 и TLR9 в риске развития атопического дерматита. *Медицинская иммунология.* 2023; 25 (5): 1043–8. DOI: 10.15789/1563-0625-AOS-2807.
10. Смолкина О. Ю., Быстрицкая Е. П., Свитич О. А., Пирузян А. Л., Денисова Е. В., Корсунская И. М., и др. Анализ метилирования ДНК в пораженной и непораженной коже у взрослых пациентов с атопическим дерматитом. *Молекулярная медицина.* 2021; 19 (1): 53–58. DOI: 10.29296/24999490-2021-01-08.
11. Gupta J, Margolis DJ. Filaggrin gene mutations with special reference to atopic dermatitis. *Curr Treat Options Allergy.* 2020; 7 (3): 403–13. DOI: 10.1007/s40521-020-00271-x.
12. Barker JN, Palmer CN, Zhao Y, Liao H, Hull PR, et al. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol.* 2007; 127 (3): 564–7. DOI: 10.1038/sj.jid.5700587.
13. Тамразова О. Б., Глухова Е. А. Уникальная молекула филаггрина в структуре эпидермиса и ее роль в развитии ксероза и патогенеза атопического дерматита. *Клиническая дерматология и венерология.* 2021; 20 (6): 102–10. DOI: 10.17116/klinderma202120061102.
14. Moosbrugger-Martinez V, Leprince C, Méchin M-C, Simon M, Blunder S, Gruber R, et al. Revisiting the roles of filaggrin in atopic dermatitis. *Int J Mol Sci.* 2022; 23: 5318. DOI: 10.3390/ijms23105318/.
15. Chiricoczi A, Maurelli M, Calabrese L, Peris K, Girolomoni G. Overview of atopic dermatitis in different ethnic groups. *J Clin Med.* 2023; 12: 2701. DOI: 10.3390/jcm12072701.
16. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2011; 365 (14): 1315–27. DOI: 10.1056/NEJMra1011040.
17. X.F. Colin C. Wong, Simon L.I.J. Denil, Jia Nee Foo, Huijia

- Chen, Angeline Su Ling Tay, Rebecca L. Haines, et al. Array-based sequencing of filaggrin gene for comprehensive detection of disease-associated variants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 141 (2): 814–6. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.001.
18. Thyssen JP, Bikle DD, Elias PM. Evidence that loss-of-function filaggrin gene mutations evolved in northern Europeans to favor intracutaneous vitamin D3 production. *Evol Biol*. 2014; 41 (3): 388–96. DOI: 10.1007/s11692-014-9282-7.
 19. Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123 (6): 1361–70. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.03.036.
 20. Макарова С. И., Митрофанов Д. В., Комова Е. Г., Каложкин И. В., Шинтяпина А. Б., Казначеева Л. Ф., и др. Роль мутаций гена филаггрина, ведущих к снижению количества белка, в развитии атопического дерматита и бронхиальной астмы у детей. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (3): 58–63. DOI: 10.18699/SSMJ20210308.
 21. Варламов Е. Е., Пампура А. Н. Первичная профилактика атопического дерматита у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2015; 60 (5): 21–25.
 22. Gruber R, Janecke A, Fauth C, et al. Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15, 179–84. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201742.
 23. Еремина А. А., Герлингер А. В., Макеенко О. А., Кох Н. В., Сергеева И. Г. Внедрение современных генетических и инструментальных методов обследования в ведении пациентов с вульгарным ихтиозом и атопическим дерматитом. *Клиническая дерматология и венерология*. 2023; 22 (4): 399–405. DOI: 10.17116/klinderma202322041399.
 24. Макеенко О. А., Кох Н. В., Сергеева И. Г. Клинический разбор пациентов гомозигот по мутации 2282del4 (rs558269137) в гене филаггрина. *Клиническая дерматология и венерология*. 2022; 21 (3): 390–98. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17116/klinderma202221031390>.
 25. Чикин В. В., Карамова А. Э., Кубанов А. А., Жилова М. Б., Городничев П. В., Аулова К. М. Узкополосная средневолновая ультрафиолетовая терапия больных атопическим дерматитом: анализ факторов, влияющих на выраженность терапевтического эффекта. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2023; 99 (5): 52–63. DOI: 10.25208/vdv15828.
 26. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 1980; 92 (Suppl): 44–47.
 27. Wollenberg A, Christen-Zäch S, Taieb A, Paul C, Thyssen JP, de Bruin-Weller M, et al. European Task Force on Atopic Dermatitis/EADV Eczema Task Force. EADV/EADV Eczema task force 2020 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adults and children. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (12): 2717–44. DOI: 10.1111/jdv.16892.
 28. Standard Nucleotide BLAST. National Center for Biotechnology Information. U.S National Library of Medicine. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.
 29. Максимова Ю. В., Свечникова Е. В., Максимов В. Н., Лыква С. Г. Мутации в гене филаггрина и атопический дерматит. *Клиническая дерматология и венерология*. 2014; 3: 58–62.
 30. Dvomyk V, Ponomarenko I, Belyaeva T, Reshetnikov E, Churnosov M. Filaggrin gene polymorphisms are associated with atopic dermatitis in women but not in men in the Caucasian population of Central Russia. *PLoS ONE*. 2021; 16 (12): e0261026. DOI: 10.1371/journal.pone.0261026.
 31. Gimalova GF, Karunas AS, Fedorova YY, Khusnutdinova EK. The study of filaggrin gene mutations and copy number variation in atopic dermatitis patients from Volga-Ural region of Russia. *Gene*. 2016; 591: 85–89. DOI: 10.1016/j.gene.2016.06.054.
 32. Greisenegger E, Novak N, Maintz L, Bieber T, Zimprich F, Haubenberger D, et al. Analysis of four prevalent filaggrin mutations (R501X, 2282del4, R2447X and S3247X) in Austrian and German patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010; 24: 607–10. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2009.03469.x.
 33. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118 (1): 214–9. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.05.004. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118 (4): 922. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118 (3): 724.
 34. Giardina E, Paolillo N, Sinibaldi C, Novelli G. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology*. 2008; 216 (1): 83–4. DOI: 10.1159/000109365.
 35. Luukkonen TM, Kiiski V, Ahola M, Mandelin J, Virtanen H, Pöyhönen M, et al. The value of FLG null mutations in predicting treatment response in atopic dermatitis: an observational study in Finnish patients. *Acta Derm Venereol*. 2017; 97 (4): 456–63. DOI: 10.2340/00015555-2578.
 36. dbSNP Short Genetic Variations. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs558269137#frequency_tab (accessed 18 Dec 2023).
 37. Smieszek SP, Welsh S, Xiao C, et al. Correlation of age-of-onset of atopic dermatitis with filaggrin loss-of-function variant status. *Sci Rep*. 2020; 10: 2721. DOI: 10.1038/s41598-020-59627-7.
 38. Schuler CF, Allison C. Billi, Emanuel Mavarakis, Lam C. Tsoi, Johann E. Gudjonsson, Novel insights into atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2023; 151 (5): 1145–54. DOI: 10.1016/j.jaci.2022.10.023.
 39. Bakker DS, de Graaf M, Nierkens S, Delemarre EM, Knol E, van Wijk F, et al. Unraveling heterogeneity in pediatric atopic dermatitis: identification of serum biomarker based patient clusters. *J Allergy Clin Immunol*. 2022; 149: 125–34. DOI: 10.1016/j.jaci.2021.06.029.
 40. Tokura Y, Hayano S. Subtypes of atopic dermatitis: From phenotype to endotype. *Allergology International*. 2022; 71 (1): 14–24. DOI: 10.1016/j.allit.2021.07.003.

References

1. Zaslavskij DV, Svitich OA, Kudrjavceva AV. Atopicheskij dermatit. *Mezhdisciplinarnyj podhod k diagnostike i lecheniju: Rukovodstvo dlja vrachej*. Moskva: GJeOTAR-Media, 2024; 288 s. Russian.
2. Klinicheskie rekomendacii. Atopicheskij dermatit. *Utverzhdeny Minzdravom RF*. Dostupno po ssylke: https://www.nrcci.ru/specialistam/klinrecommend/atopic_dermatitis_2020.pdf. Russian.
3. Kubanov AA, Bogdanova EV. Resursy i rezul'taty dejatel'nosti medicinskih organizacij, okazyvajushih medicinskuju pomoshh' po profilju «dermatovenerologija», v Rossijskoj Federacii v 2016–2022 gg. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2023; 99 (4): 18–40. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.25208/vdv12385>. Russian.
4. Kotova EG, Kobjakova OS, Kubanov AA, Starodubov VI, Aleksandrova GA, Bogdanova EV, i dr. Resursy i dejatel'nost' medicinskih organizacij dermatovenerologicheskogo profilja. *Zabolevaemost' infekcijami, peredavaemymi polovym putem, zaraznymi kozhnymi boleznyami i boleznyami kozhi v 2022 godu: statisticheskie materialy*. M.: FGBU «CNIOIZ» Minzdrava Rossii, 2023; 209 s. DOI: 10.21045/978-5-94116-130-0-2023. Russian.
5. Traidl S, Freimooser S, Werfel T. Janus kinase inhibitors for the therapy of atopic dermatitis. *Allergol Select*. 2021; 5: 293–304. DOI: 10.5414/ALX02272E.
6. Gelezhe KA, Kudravtseva AV, Ryzhii E, Khachatryan LG, Bogdanova EA, Svitich OA. The role of the skin microbiome in the development of allergic inflammation in atopic dermatitis. *New Armenian Medical Journal*. 2021; 15 (1): 100–8.
7. Gorskij VS, Bijumina VA. Sovremennye predstavlenija o patogeneze atopicheskogo dermatita. *Immunopatologija, allergologija, infektologija*. 2022; 3: 70–76. DOI: 10.14427/jipai.2022.3.70. Russian.
8. Beljaeva TM, Ponomarenko IV, Churnosov MI. Molekuljarno-geneticheskie determinanty atopicheskogo dermatita (dannye polnogenomnyh issledovanij). *Klinicheskaja dermatologija i venerologija*. 2020; 19 (5): 615–21. DOI: 10.17116/klinderma202019051615. Russian.

9. Svitich OA, Olisova OJu, Meremjanina EA., Rasskazova ND, Fomina VA, Potapova MB. Rol' polimorfnyh markerov v genah TLR2, TLR4 i TLR9 v riske razvitiya atopicheskogo dermatita. *Medicinskaja immunologija*. 2023; 25 (5): 1043–8. DOI: 10.15789/1563-0625-AOS-2807. Russian.
10. Smolkina OJu, Bystrickaja EP, Svitich OA, Piruzjan AL, Denisova EV, Korsunskaja IM, i dr. Analiz metilirovanija DNK v porazhennoj i neporazhennoj kozhe u vzroslyh pacientov s atopicheskim dermatitom. *Molekuljarnaja medicina*, 2021; 19 (1): 53–58. DOI: 10.29296/24999490-2021-01-08. Russian.
11. Gupta J, Margolis DJ. Filaggrin gene mutations with special reference to atopic dermatitis. *Curr Treat Options Allergy*. 2020; 7 (3): 403–13. DOI: 10.1007/s40521-020-00271-x.
12. Barker JN, Palmer CN, Zhao Y, Liao H, Hull PR, et al. Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *J Invest Dermatol*. 2007; 127 (3): 564–7. DOI: 10.1038/sj.jid.5700587.
13. Tamrazova OB, Gluhova EA. Unikal'naja molekula filaggrin v strukture jepidermisa i ee rol' v razviti kseroza i patogeneza atopicheskogo dermatita. *Klinicheskaja dermatologija i venerologija*. 2021; 20 (6): 102–10. DOI: 10.17116/klinderma202120061102. Russian.
14. Moosbrugger-Martinez V, Leprince C, Méchin M-C, Simon M, Blunder S, Gruber R, et al. Revisiting the roles of filaggrin in atopic dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2022; 23: 5318. DOI: 10.3390/ijms23105318/.
15. Chiricozzi A, Maurelli M, Calabrese L, Peris K, Girolomoni G. Overview of atopic dermatitis in different ethnic groups. *J Clin Med*. 2023; 12: 2701. DOI: 10.3390/jcm12072701.
16. Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin mutations associated with skin and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2011; 365 (14): 1315–27. DOI: 10.1056/NEJMra1011040.
17. X.F. Colin C. Wong, Simon L.I.J. Denil, Jia Nee Foo, Huijia Chen, Angeline Su Ling Tay, Rebecca L. Haines, et al. Array-based sequencing of filaggrin gene for comprehensive detection of disease-associated variants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2018; 141 (2): 814–6. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.10.001.
18. Thyssen JP, Bikle DD, Elias PM. Evidence that loss-of-function filaggrin gene mutations evolved in northern Europeans to favor intracutaneous vitamin D3 production. *Evol Biol*. 2014; 41 (3): 388–96. DOI: 10.1007/s11692-014-9282-7.
19. Rodríguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, et al. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123 (6): 1361–70. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.03.036.
20. Makarova SI, Mitrofanov DV, Komova EG, Kaloshkin IV, Shintjapina AB, Kaznacheeva LF, i dr. Rol' mutacij gena filaggrina, vedushih k snizheniju kolichestva belka, v razviti atopicheskogo dermatita i bronhial'noj astmy u detej. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal*. 2021; 41 (3): 58–63. DOI: 10.18699/SSMJ20210308. Russian.
21. Varlamov EE, Pampura AN. Pervichnaja profilaktika atopicheskogo dermatita u detej. *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 2015; 60 (5): 21–25. Russian.
22. Gruber R, Janecke A, Fauth C, et al. Filaggrin mutations p.R501X and c.2282del4 in ichthyosis vulgaris. *Eur J Hum Genet*. 2007; 15, 179–84. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201742.
23. Eremina AA, Gerlinger AV, Makeenko OA, Koh NV, Sergeeva IG. Vnedrenie sovremennyh genicheskijh i instrumental'nyh metodov obsledovanija v vedenii pacientov s vul' garmym ihtiozom i atopicheskim dermatitom. *Klinicheskaja dermatologija i venerologija*. 2023; 22 (4): 399–405. DOI: 10.17116/klinderma202322041399. Russian.
24. Makeenko OA, Koh NV, Sergeeva IG. Klinicheskij razbor pacientov gomozigot po mutacij 2282del4 (rs558269137) v gene filaggrina. *Klinicheskaja dermatologija i venerologija*. 2022; 21 (3): 390–98. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.17116/klinderma202221031390>. Russian.
25. Chikin VV, Karamova AJe, Kubanov AA, Zhilova MB, Gorodnichev PV, Aulova KM. Uzkopolosnaja srednevolnovaja ul'traioletovaja terapija bol'nyh atopicheskim dermatitom: analiz faktorov, vlijajushih na vyrazhennost' terapevticheskogo jeffekta. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2023; 99 (5): 52–63. DOI: 10.25208/vdv15828. Russian.
26. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta DermVenereol*. 1980; 92 (Suppl): 44–47.
27. Wollenberg A, Christen-Zäch S, Taieb A, Paul C, Thyssen JP, de Bruin-Weller M, et al. European Task Force on Atopic Dermatitis/EADV Eczema Task Force. ETFAD/EADV Eczema task force 2020 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis in adults and children. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020; 34 (12): 2717–44. DOI: 10.1111/jdv.16892.
28. Standard Nucleotide BLAST. National Center for Biotechnology Information. U.S National Library of Medicine. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch.
29. Maksimova JuV, Svechnikova EV, Maksimov VN, Lykva SG. Mutacii v gene filaggrina i atopicheskij dermatit. *Klinicheskaja dermatologija i venerologija*. 2014; 3: 58–62. Russian.
30. Dvomyk V, Ponomarenko I, Belyaeva T, Reshetnikov E, Churnosov M. Filaggrin gene polymorphisms are associated with atopic dermatitis in women but not in men in the Caucasian population of Central Russia. *PLoS ONE*. 2021; 16 (12): e0261026. DOI: 10.1371/journal.pone.0261026.
31. Gimalova GF, Karunas AS, Fedorova YY, Khusnutdinova EK. The study of filaggrin gene mutations and copy number variation in atopic dermatitis patients from Volga-Ural region of Russia. *Gene*. 2016; 591: 85–89. DOI: 10.1016/j.gene.2016.06.054.
32. Greisenegger E, Novak N, Maintz L, Bieber T, Zimprich F, Haubenberger D, et al. Analysis of four prevalent filaggrin mutations (R501X, 2282del4, R2447X and S3247X) in Austrian and German patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010; 24: 607–10. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2009.03469.x.
33. Weidinger S, Illig T, Baurecht H, Irvine AD, Rodriguez E, Diaz-Lacava A, et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118 (1): 214–9. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.05.004. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118 (4): 922. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118 (3): 724.
34. Giardina E, Paolillo N, Sinibaldi C, Novelli G. R501X and 2282del4 filaggrin mutations do not confer susceptibility to psoriasis and atopic dermatitis in Italian patients. *Dermatology*. 2008; 216 (1): 83–4. DOI: 10.1159/000109365.
35. Luukkonen TM, Kiiski V, Ahola M, Mandelin J, Virtanen H, Pöyhönen M, et al. The value of FLG null mutations in predicting treatment response in atopic dermatitis: an observational study in finnish patients. *Acta Derm Venereol*. 2017; 97 (4): 456–63. DOI: 10.2340/00015555-2578.
36. dbSNP Short Genetic Variations. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs558269137#frequency_tab (accessed 18 Dec 2023).
37. Smieszek SP, Welsh S, Xiao C, et al. Correlation of age-of-onset of atopic dermatitis with filaggrin loss-of-function variant status. *Sci Rep*. 2020; 10: 2721. DOI: 10.1038/s41598-020-59627-7.
38. Schuler CF, Allison C. Billi, Emanuel Maverakis, Lam C. Tsoi, Johann E. Gudjonsson, Novel insights into atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2023; 151 (5): 1145–54. DOI: 10.1016/j.jaci.2022.10.023.
39. Bakker DS, de Graaf M, Nierkens S, Delemarre EM, Knol E, van Wijk F, et al. Unraveling heterogeneity in pediatric atopic dermatitis: identification of serum biomarker based patient clusters. *J Allergy Clin Immunol*. 2022; 149: 125–34. DOI: 10.1016/j.jaci.2021.06.029.
40. Tokura Y, Hayano S. Subtypes of atopic dermatitis: From phenotype to endotype. *Allergology International*. 2022; 71 (1): 14–24. DOI: 10.1016/j.alit.2021.07.003.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МАРКЕРОВ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

И. С. Мамедов¹, И. В. Золкина²✉, В. С. Сухоруков³, А. И. Крапивкин¹

¹ Научно-практический центр специализированной помощи детям имени В. Ф. Войно-Ясенецкого, Москва, Россия

² ООО «Клиника новых медицинских технологий ArchiMed», Москва, Россия

³ Научный центр неврологии, Москва, Россия

Для развития персонализированной и превентивной медицины большое значение приобретает детальное изучение метаболома с применением масс-спектрометрии. Только своевременная лабораторная диагностика с помощью высокотехнологичных методов хроматографического анализа может помочь в выявлении пациентов с нарушениями метаболизма аминокислот и ацилкарнитиннов. Целью работы было определить эффективность классических и дополнительных маркеров нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитиннов, детектируемых хромато-масс-спектрометрическими методами, в диагностике наследственных болезней обмена у детей, создать специфические панели наиболее эффективных показателей и определить потенциальную диагностическую эффективность выявления взаимосвязей между показателями аминокислот и ацилкарнитиннов у педиатрических пациентов с врожденными нарушениями метаболизма. Были изучены профили аминокислот и ацилкарнитиннов в пятках крови методом высокоэффективной хромато-масс-спектрометрии у пациентов в возрасте от 6 месяцев до 16 лет (48 мальчиков и 32 девочки) с подозрением на аминоацидопатию и органические ацидурии/ацидемии. Группа сравнения состояла из 35 детей с подозрением на пероксисомные болезни обмена, контрольная группа — из 40 практически здоровых детей разных возрастных групп. По полученным данным, между группами маркеров был проведен корреляционный анализ. Содержание метаболитически наиболее близких соединений имело выраженную корреляционную взаимосвязь ($r < 0,8$, $p < 0,001$). Однако такая взаимосвязь проявилась и среди метаболитически слабо связанных соединений (коэффициент корреляции варьировал от 0,45 до 0,73 ($p < 0,001$) для некоторых групп соединений). Так, ацилкарнитинный профиль может быть предложен в качестве потенциального дополнительного маркера при пограничных показателях фенилаланина, а сумма нормализованных показателей ацилкарнитиннов (C12+C16) может быть потенциальным вторичным маркером фенилкетонурии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, аминокислоты, ацилкарнитины, наследственные болезни обмена, корреляционный анализ, дифференциальная диагностика

Вклад авторов: И. С. Мамедов — идея исследования; И. С. Мамедов, И. В. Золкина — методология и проведение исследования, статистическая обработка данных; И. В. Золкина — написание статьи; И. С. Мамедов, В. С. Сухоруков, И. В. Золкина, А. И. Крапивкин — редактирование статьи; А. И. Крапивкин — администрирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Российского государственного медицинского университета им. Н. И. Пирогова РГМУ (протокол № 94 от 14 декабря 2009 г.). Всеми родителями или опекунами участников исследования было подписано добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Золкина Ирина Вячеславовна
ул. Вавилова, д. 68, к. 2, г. Москва, 119261, Россия; zolkina_ira@mail.ru

Статья получена: 11.01.2024 **Статья принята к печати:** 29.01.2024 **Опубликована онлайн:** 15.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.003

DETERMINING THE DIAGNOSTIC VALUE OF THE MARKERS OF CONGENITAL METABOLIC DISORDERS BY CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

Mamedov IS¹, Zolkina IV²✉, Sukhorukov VS³, Krapivkin AI¹

¹ Voino-Yasenyetsky Scientific and Practical Center for Specialized Assistance to Children, Moscow, Russia

² LLC Clinic of New Medical Technologies "ArchiMed", Moscow, Russia

³ Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Thorough investigation of metabolome by mass spectrometry is of great importance for personalized and preventive medicine. It is only timely laboratory diagnosis involving the use of high-tech chromatographic analysis methods that can help identify the patients with disorders of amino acid and acylcarnitine metabolism. The study was aimed to determine the efficacy of conventional and additional markers of metabolic disorders of amino acids and acylcarnitines detected by chromatography–mass spectrometry for the diagnosis of congenital metabolic disorders in children, as well as to create specific panels of the most effective indicators and determine the potential diagnostic efficacy of identification of the relationships between the levels of amino acids and acylcarnitines in pediatric patients with congenital metabolic disorders. We assessed amino acid and acylcarnitine profiles in blood spots by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in patients aged 6 months to 16 years (48 boys and 32 girls) with suspected aminoacidopathy and organic aciduria/acidemia. The comparison group consisted of 35 children with suspected peroxisomal metabolic disorders, the control group included 40 generally healthy children of various age groups. The data obtained were used to conduct the analysis of correlations between the groups of markers. Strong correlation was revealed for the levels of metabolically most closely related compounds ($r < 0,8$, $p < 0,001$). However, a similar relationship between metabolically not closely related compounds (correlation coefficient 0.45–0.73 ($p < 0,001$)) was revealed for some groups of compounds. Thus, the acylcarnitine profile can be proposed as an additional potential marker to be used in cases of borderline phenylalanine levels, and the sum of normalized acylcarnitine levels (C12+C16) can be a potential secondary marker of phenylketonuria.

Keywords: mass-spectrometry, amino acids, acylcarnitines, hereditary metabolic diseases, correlation analysis, differential diagnosis

Author contribution: Mamedov IS — research idea; Mamedov IS, Zolkina IV — research methods and procedure, statistical data processing; Zolkina IV — manuscript writing; Mamedov IS, Sukhorukov VS, Zolkina IV, Krapivkin AI — manuscript editing; Krapivkin AI — research management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 94 dated 14 December 2009). All parents or caregivers of the subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Zolkina
Vavilova, 68, k. 2, Moscow, 119261, Russia; zolkina_ira@mail.ru

Received: 12.01.2024 **Accepted:** 29.01.2024 **Published online:** 15.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.003

В ведущих странах мира масс-спектрометрия является одним из новейших, но в то же время самым востребованным методом лабораторной медицины. Детальное изучение метаболизма без применения масс-спектрометрии невозможно, и для развития инновационных технологичной персонализированной медицины, обеспечивающих переход от реактивной к предсказательной и превентивной медицине, большое значение приобретают массивы данных, полученных этим методом. Так как наиболее перспективным направлением в решении комплекса задач персонализированной медицины является внедрение в практику профилактических обследований и информационных технологий для разработки алгоритмов диагностики заболеваний, метод tandemной масс-спектрометрии представляется наиболее подходящим для реализации этих направлений [1–3].

По частоте встречаемости нарушения метаболизма аминокислот и ацилкарнитинов нередко по сравнению с другими наследственными болезнями обмена. Большинство врожденных нарушений метаболизма, многие из которых представляют собой ацидемии и проявляются в период новорожденности, встречаются с частотой 1:1000 – 1:5000 новорожденных. Индивидуальная патогенетическая картина нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов осложнена тем, что отдельные клинические признаки в различных сочетаниях и в различной степени выраженности, могут проявляться при разных типах нарушения обмена. В результате, только своевременная лабораторная диагностика, с помощью высокотехнологичных методов хроматографического анализа, может помочь в выявлении пациентов с данными патологиями.

Целью данной работы было определить эффективность основных (классических) маркеров нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов, детектируемых хромато-масс-спектрометрическими методами, в диагностике наследственных болезней обмена и создать специфические панели наиболее эффективных показателей, а также определить потенциальную диагностическую эффективность выявления взаимосвязей между масс-спектрометрическими показателями у детей с наследственными болезнями обмена аминокислот и ацилкарнитинов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в научно-исследовательском клиническом институте педиатрии имени академика Вельтищева обособленного структурного подразделения ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения России, а также в Государственном бюджетном учреждении «Научно-практический центр специализированной помощи детям имени В. Ф. Войно-Ясенецкого» в период с 2012 по 2023 г.

Группу больных составили дети и подростки с подозрением на аминокислотопатии и органические ацидурии/ацидемии, а также пациенты с диагностически недифференцированными патологиями обмена веществ. Возраст пациентов, вошедших в группу, составил от 6 месяцев до 16 лет. По полу группа пациентов распределялась следующим образом: 48 мальчиков и 32 девочки. Критерии включения: дети с момента рождения и до 18 лет; наличие в анамнезе следующей симптоматики: задержка психомоторного и физического развития, судороги, нарушение мышечного тонуса, атаксия, наличие комплексной симптоматики с увеличением

печени, снижением остроты зрения, дерматитом. Критерии исключения: возраст старше 18 лет, наличие сопутствующих заболеваний с тяжелым течением (например, детский церебральный паралич, врожденные пороки развития почек и мочевыводящих путей, тяжелые сердечно-сосудистые патологии), которые могли осложнить выполнение условий обследования или навредить пациенту. В группу сравнения для этой группы больных вошли 35 детей с подозрением на пероксисомные болезни обмена. Критерии включения в группу сравнения: возраст до 18 лет, наличие в анамнезе резких и характерных дефектов миграции нейронов, микроузелкового цирроза печени, кист почек, точечных хондродисплазий, помутнения роговицы, катаракты, глаукомы и ретинопатии, врожденных пороков сердца и дизморфических проявлений. Контрольная группа состояла из 40 практически здоровых детей разных возрастных групп.

В исследовании использовали методику количественного определения 12 аминокислот и 30 ацилкарнитинов в сухих пятнах крови методом высокоэффективной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией [4–7], которая была модифицирована следующим образом: для повышения чувствительности оптимизированы параметры масс-спектрометрического детектирования всех аналитов, а для сокращения времени анализа единичного образца — увеличена скорость потока элюента.

Стандартные образцы: лиофилизированная смесь внутренних стандартов MassChrom®AminoAcids and Acylcarnitines (Chromsystems; Германия).

Реактивы: ацетонитрил (LC/MS Grade) (Fisher Scientific; США), бутанол-1 (ч.д.а.; «Химмед», Россия), n-бутилацетат (ч.д.а.; «Химмед», Россия), соляная кислота (ч.д.а.; «Химмед», Россия), метанол (ч.д.а.; Sigma-Aldrich, Германия).

Лабораторные посуда и материалы: фильтровальная бумага для отбора биопроб Whatman 903® (Whatman; США), 96-луночный микропланшет с защитной адгезионной пленкой (Eppendorf; Германия).

Лабораторное оборудование: панчер DSB Puncher (PerkinElmer; США), термощейкер ST-3 (ELMI; Латвия), испарительная система (модель EVA EC-S) (VLM; Германия), дозаторы механические одноканальные Sartorius (модель Biohit Proline) (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy; Финляндия) следующих объемов: 0–100,0 мкл, 0–200,0 мкл с оригинальными одноразовыми наконечниками.

Забор биоматериала

Образец крови из пятки новорожденного или пальца пациента старшего возраста забирали на специальную бумагу Whatman 903® в виде бланков для взятия капиллярной крови и сушили при комнатной температуре до полного высыхания. Пропитанную биоматериалом специальную бумагу хранили при комнатной температуре, до одного месяца.

Пробоподготовка биоматериала

Для проведения анализа из сухого пятна пробы крови при помощи панчера вырезали круг диаметром 3,1 мм (соответствует 3,2 мкл образца крови), который помещали в лунку микропланшета. Для экстракции к нему добавляли 200,0 мкл смеси внутренних стандартов (предварительно растворенной в ацетонитриле), далее микропланшет во избежание испарения и разбрызгивания образца

Таблица. Заболевания, выявленные в группе пациентов с подозрением на аминокислотопатию и органические ацидемии/ацидурии, по результатам анализа образцов сухих пятен крови методом высокоэффективной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Нозологическая форма	Изменение уровня содержания маркера(-ов)	Число пациентов
Заболевания, диагностированные по результатам анализов образцов сухих пятен крови пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС		
Фенилкетонурия, обусловленная дефицитом фенилаланингидроксилазы	Повышение фенилаланина, понижение тирозина	7
Гомоцистинурия, обусловленная нарушениями метаболизма кобаламина	Понижение метионина, наличие гомоцистина	5
Аргининемия	Повышение аргинина	4
Кобаламин А (cbIA) и кобаламин В (cbIB) метилмалоновая ацидемия (ММА)	Повышение пропионилкарнитина (C3) и метилмалонилкарнитина (C4DC)	5
Дефицит среднепечочной ацил-КоА-дегидрогеназы (MCAD)	Повышение ацилкарнитинов со средней длиной цепи (C6, C8, C10)	3
Дефект транспорта карнитина (CUD)	Понижение свободного карнитина (C0)	1
Глутаровая ацидемия I типа (GA I)	Повышение глутарилкарнитина (C5DC)	3
Тирозинемия I типа	Повышение тирозина, фенилаланина и метионина	3
Тирозинемия II типа	Повышение тирозина	1
Гипераммониемия с дефицитом N-ацетилглутаматсинтетазы	Повышение аланина	5
Цитруллинемия	Повышение цитруллина, понижение аргинина	2
Изовалериановая ацидемия/ изовалериановая ацидурия (IVA)	Повышение изовалерилкарнитина (C5)	2
Пропионовая ацидемия (PA)	Повышение пропионилкарнитина (C3) и соотношения C3/C2	2
Некетотическая гиперглицинемия	Повышение глицина	5
Болезнь «кленового сиропа» (лейцинурия) (MSUD)	Повышение суммарного показателя (лейцин + изолейцин)	6

закрывали защитной адгезионной пленкой и перемешивали на шейкере при 600 об./мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Для упаривания с микропланшета удаляли защитную пленку, после чего образец упаривали при 60 °С в токе воздуха досуха. Для дериватизации образца к его сухому остатку в микропланшете добавляли 60,0 мкл дериватирующего реагента (смесь бутанола-1, n-бутилацетата, соляной кислоты в объемном соотношении 7 : 2 : 1), после этого микропланшет закрывали защитной пленкой и инкубировали при 60 °С и 600 об./мин в течение 15 мин. Для концентрирования образца с микропланшета удаляли защитную пленку, и образец упаривали в токе воздуха досуха. Заключительный этап пробоподготовки включал в себя перерастворение сухого остатка в 10,0 мкл метанола, после чего образец перемешивали при 600 об./мин в течение 1 мин при комнатной температуре. В ВЭЖХ-систему вводили 10,0 мкл подготовленного образца.

Хроматографические условия

Анализ выполняли с использованием ВЭЖХ-системы, состоящей из двойного градиентного насоса Agilent 1200, вакуумного дегазатора, термостата хроматографических колонок и автосэплера CTC HTS PAL, соединенных с масс-детектором Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies; США). В качестве колонки использовали муфту-переходник, в качестве мобильной фазы и раствора для промывки иглы инжектора — ацетонитрил. Настройки ВЭЖХ-системы: объем инъекции — 10,0 мкл, время анализа — 1,7 мин, скорость потока подвижной фазы во время уравновешивания системы — 0,5 мл/мин.

Обработка данных

Полученные данные выполняли с помощью программного обеспечения MassHunter® (Agilent Technologies; США).

Количественное определение аналитов проводили по методу внутреннего стандарта. Концентрацию каждого аналита в образце вычисляли по формуле (1) как отношение интенсивности его аналитического сигнала в образце к интенсивности аналитического сигнала соответствующего внутреннего стандарта в этом же образце, с последующим умножением на концентрацию данного внутреннего стандарта в смеси внутренних стандартов (калибровочной смеси):

$$c_{\text{A}} (\text{мкмоль/л}) = \left(\frac{I_{\text{A}}}{I_{\text{IS}}} \right) \times c_{\text{IS}} (\text{ммоль/л}), \quad (1)$$

где c_{A} (мкмоль/л) — концентрация аналита в образце (мкмоль/л); I_{A} — интенсивность аналитического сигнала аналита в образце; c_{IS} (ммоль/л) — концентрация внутреннего стандарта в калибровочной смеси (мкмоль/л); I_{IS} — интенсивность аналитического сигнала внутреннего стандарта в образце.

Концентрации всех внутренних стандартов в смеси MassChrom®AminoAcids and Acylcarnitines (Chromsystems; Германия, регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7415 от 27.07.2018) были приведены в соответствующей сопроводительной документации.

Валидационные характеристики методики

В зависимости от аналита степень извлечения аминокислот и ацилкарнитинов из сухих пятен крови составила 69–97%;

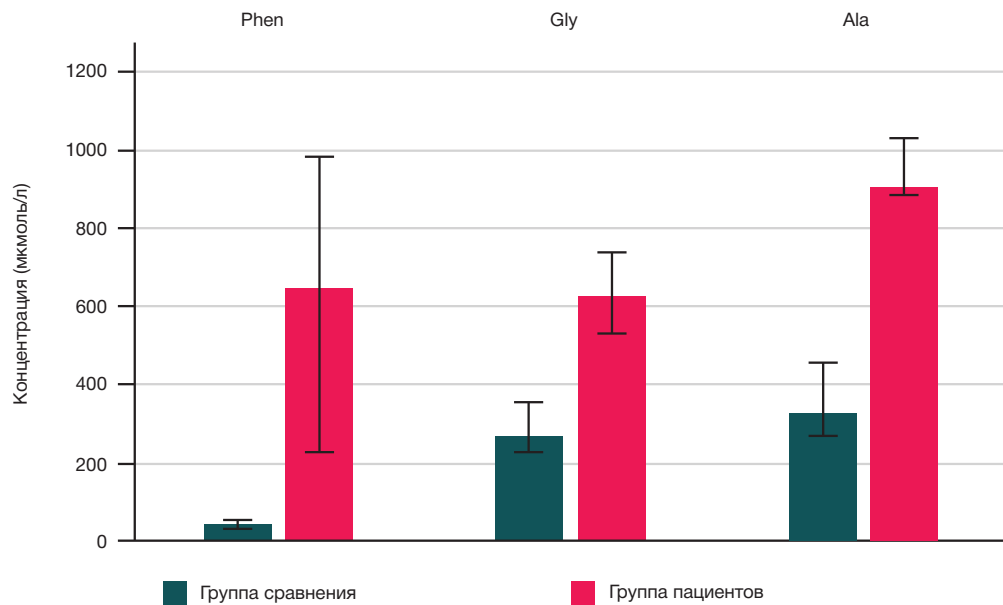


Рис. 1. Сравнение уровней маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с фенилкетонурией (диагностический маркер — фенилаланин (Phe)), неклеточической гиперглицинемией (диагностический маркер — глицин (Gly)) и гипераммониемией (диагностический маркер — аланин (Ala))

предел обнаружения для аминокислот варьировался от 2,0 до 15,6 мкмоль/л, для ацилкарнитинов — от 0,1 до 1,6 мкмоль/л; коэффициент вариации для всех анализов был в диапазоне от 3,4 до 15,6%; диапазон линейности аминокислот доходил до 2000 мкмоль/л, ацилкарнитинов — до 200 мкмоль/л.

Для доказательства диагностической значимости использовали метод построения ROC-кривых [8]. Также использовали иерархический кластерный анализ и тепловые карты на основе корреляции по Спирмену. Корреляционный анализ проводили с помощью языка программирования R, а также сравнивали значения медиан с интерквартильными диапазонами. Результаты обрабатывали с помощью статистической программы Morpheus и пакета статистических и прикладных программ для персонального компьютера SPSS Statistics 23® (IBM Corporation; США), Statistica 6.0® (StatSoftInc.; США), Excel'2007® (Microsoft Corp.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам анализа сухих пятен крови 80 детей из первой группы с подозрением на аминокислотопатию и органические ацидемии/ацидурии на основании характерных клинико-лабораторных данных выявлено 54 пациента с моногенными заболеваниями: аминокислотопатиями, органическими ацидемиями, дефектами окисления жирных кислот и дефектом транспорта карнитина, впоследствии данные диагнозы были верифицированы молекулярно-генетическими методами (таблица). По результатам анализа пятен крови 35 детей из группы сравнения (пациенты с подозрением на пероксисомные болезни) у пятерых пациентов выявлен низкий уровень свободного карнитина (C0) в крови (в диапазоне значений 10–16 мкмоль/л, при диапазоне референсного интервала 19–45 мкмоль/л), что может свидетельствовать о наличии у них других нарушений метаболизма, например вторичного дефицита

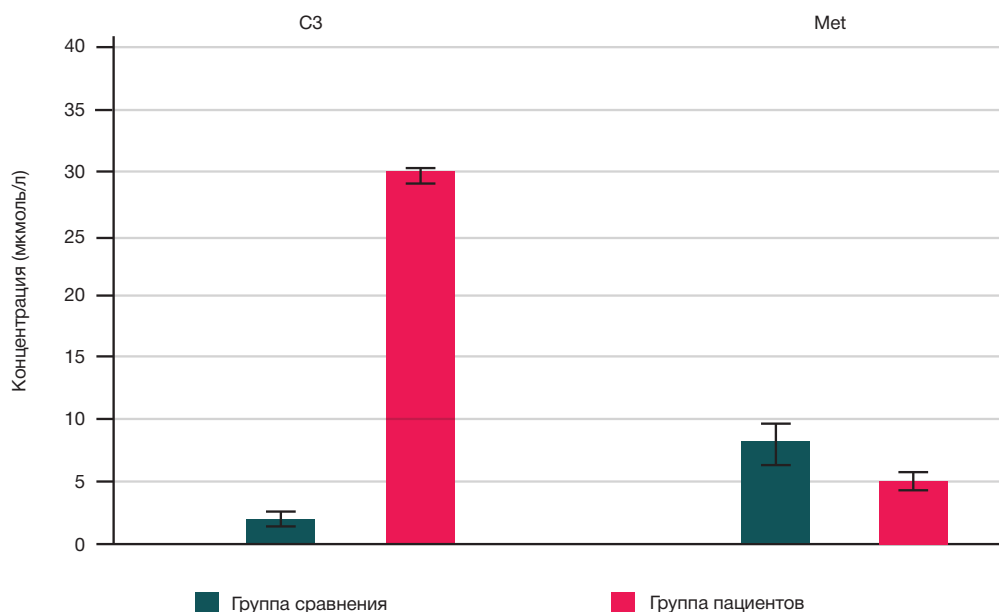


Рис. 2. Сравнение уровней маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с метилмалоновой ацидезией (диагностический маркер — пропионилкарнитин (C3)) и гомоцистинурией (диагностический маркер — метионин (Met))

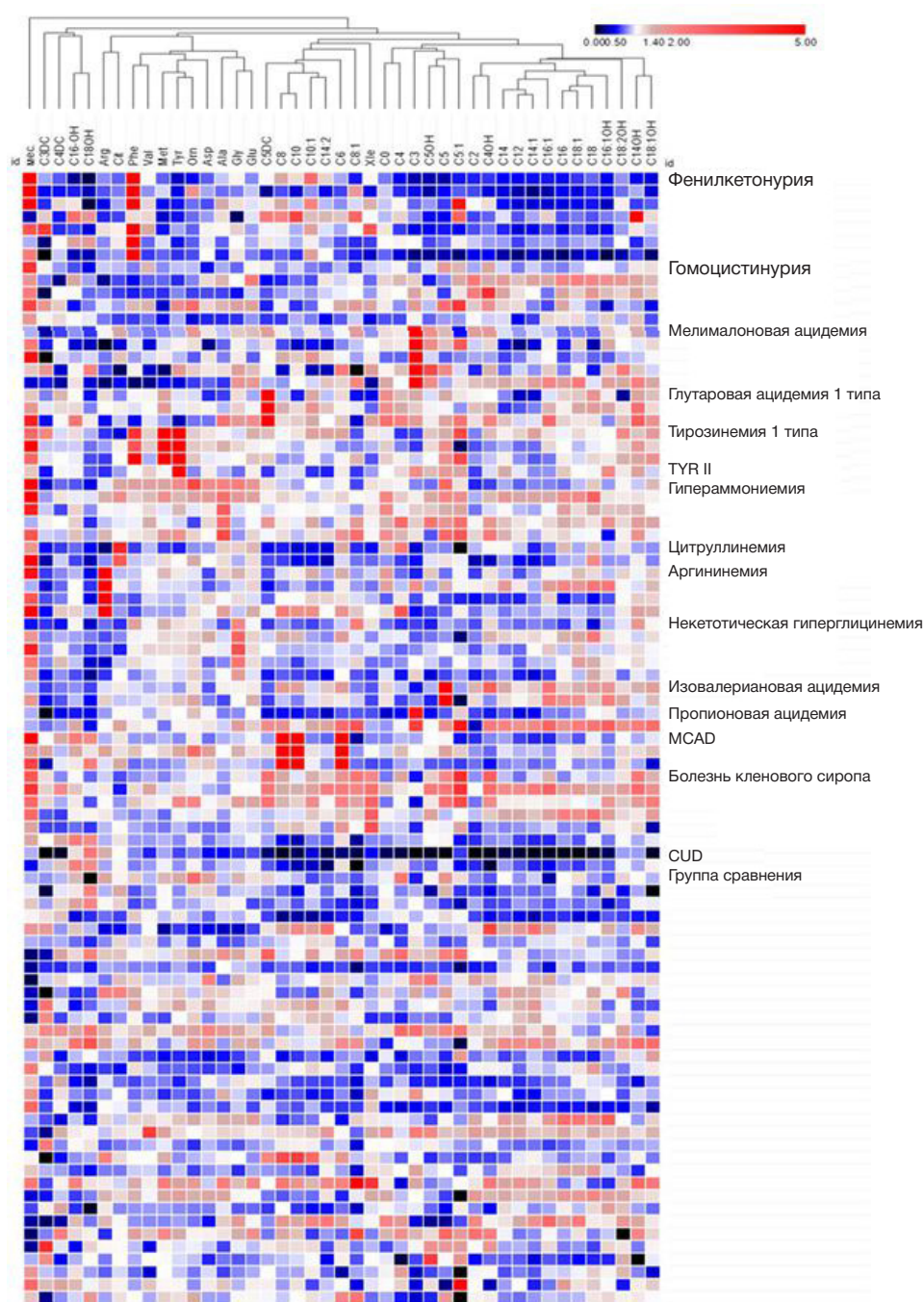


Рис. 3. Тепловая карта с дендрограммой профиля аминокислот и ацилкарнитинов у пациентов с нарушениями обмена этих веществ (отношение концентрации диагностических маркеров к их среднему значению в контрольной группе соответствует цветовой шкале)

карнитина. У остальных пациентов все показатели были в пределах референсного интервала или на их верхней границе. Результаты анализа сухих пятен крови 40 детей из контрольной группы подтвердили, что в нее вошли практически здоровые дети, так как у всех детей все исследуемые показатели были в пределах референсного интервала.

При сравнении медиан с интерквартильными диапазонами для маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с выявленными НБО веществ видно их значимое (в 10–100 раз) различие. В качестве примеров приведено сравнение уровней маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с выявленными наследственными нарушениями обмена аминокислот: фенилкетонурией (более чем в 100 раз), некетотической гиперглицинемией и гипераммониемией (рис. 1).

Обращает на себя внимание, что у пациентов с метилмалоновой ацидемией уровень основного маркера данной патологии — пропионилкарнитина (C3) значительно выше по сравнению с таковым у обследованных из группы сравнения, тогда как у пациентов с гомоцистинурией наблюдается противоположная тенденция — у пациентов с патологией уровень основного маркера — метионина (Met) ниже по сравнению с таковым у обследованных из группы сравнения (рис. 2).

Приведенные выше примеры подтверждают диагностическую значимость биохимических маркеров, определяемых хромато-масс-спектрометрическими методами в настоящем исследовании, при проведении диагностики НБО аминокислот, ацилкарнитинов.

На рис. 3 представлена тепловая карта с дендрограммой для пациентов с выявленными НБО аминокислот и

ацилкарнитинов, на которой в строках представлены данные по каждому пациенту с выявленной патологией, в столбцах — по анализируемым метаболитам, а потенциальные маркеры сгруппированы с помощью кластерного анализа.

При подробном рассмотрении данных, представленных в правом верхнем углу тепловой карты, отмечается снижение уровня короткоцепочечных и длинноцепочечных ацилкарнитинов в крови у пациентов с фенилкетонурией по сравнению с таковым у обследованных из группы сравнения, при сохранении содержания среднецепочечных ацилкарнитинов. Эти результаты подтверждены для ацилкарнитинов C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C5, C5OH непараметрическим критерием Манна-Уитни при $p < 0,05$. Таким образом, ацилкарнитиновый профиль может быть предложен в качестве потенциального дополнительного маркера при пограничных показателях фенилаланина.

Тенденция к снижению различных показателей ацилкарнитинового профиля (коротко-, средне-, и длинноцепочечных ацилкарнитинов) также наблюдается у пациентов с цитруллинемией и некетолической гиперглициемией. Несмотря на то что эти данные не достаточны для формулировки значимых статистических выводов, они, определенно, являются основанием для проведения дальнейших исследований по выявлению групп маркерных метаболитов для диагностики НБО аминокислот.

Для редких заболеваний специфичность намного более важный параметр, чем чувствительность, поэтому тесты с высокой специфичностью более диагностически эффективны [9]. На рис. 4 представлена ROC-кривая для суммы нормализованных показателей ацилкарнитинов (C12+C16). Высокое значение площади под кривой (более $> 0,9$), специфичности (близко к 100%) и чувствительности (выше 80%) позволяют предложить данный показатель в качестве потенциального вторичного маркера фенилкетонурии.

Несомненно, для диагностики фенилкетонурии уровень фенилаланина — один из самых значимых диагностических маркеров по сравнению с другими, но дальнейшее изучение профиля ацилкарнитинов даст возможность с его помощью дифференцировать фенилкетонурию от других гиперфенилаланинемий.

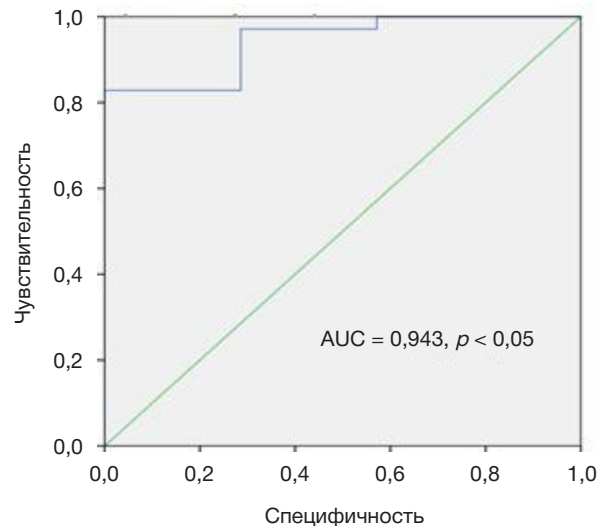


Рис. 4. ROC-кривая для суммы нормализованных ацилкарнитинов (C12+C16)

Данные примеры позволяют с уверенностью сказать, что иерархический кластерный анализ может служить надежным помощником лечащим врачам в дифференциальной диагностике наследственных болезней обмена у детей.

Между некоторыми маркерами и группами маркеров, отобранных по результатам кластерного анализа, был проведен корреляционный анализ. Его результаты представлены в виде рисунков, на которых делениями обозначены оси абсцисс и ординат для гистограмм, по диагонали расположен график распределения концентрации каждого маркерного метаболита; под диагональю представлены графики корреляционной зависимости между двумя переменными, над диагональю — значения коэффициентов корреляции и уровни их значимости.

Как и ожидалось, наиболее метаболически близкие соединения, например короткоцепочечные ацилкарнитины, имели наиболее высокую степень корреляции (рис. 5).

Однако корреляционная взаимосвязь проявлялась и среди метаболически слабо связанных аминокислот, например, метионином и тирозином ($r = 0,73$), а также содержание орнитина имело достаточно выраженную

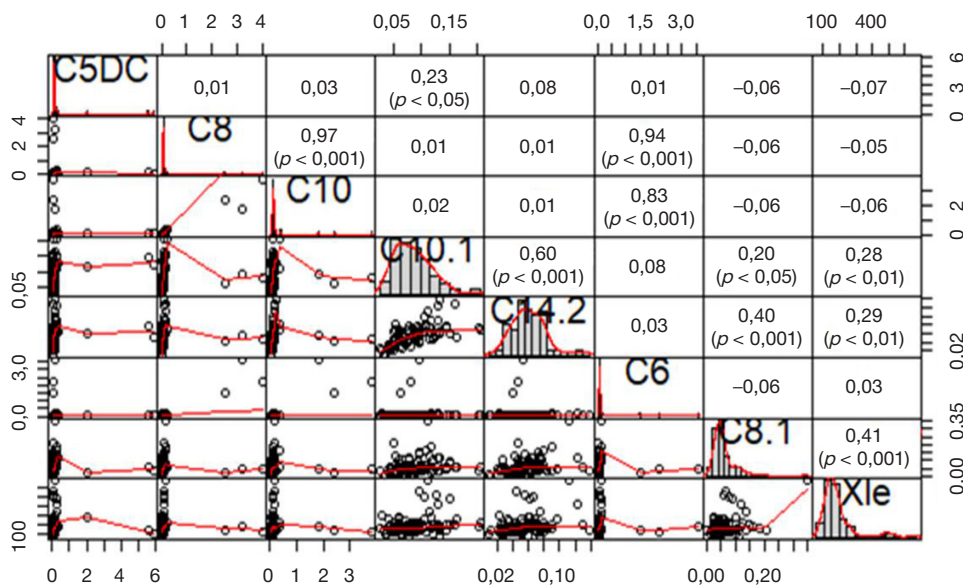


Рис. 5. Результаты корреляционного анализа в группе маркерных короткоцепочечных ацилкарнитинов (p — уровень значимости)

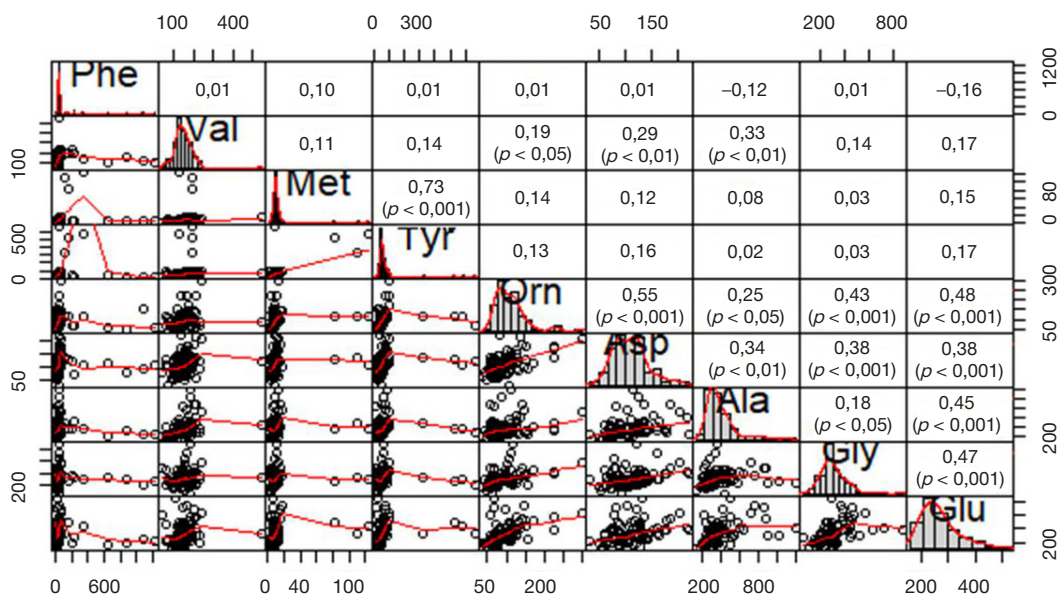


Рис. 6. Результаты корреляционного анализа в группе маркерных аминокислот (p — уровень значимости)

корреляцию с уровнями аспарагиновой кислоты, глицина и глутаминовой кислоты ($r = 0,55$ и $0,43$). Содержание последней, в свою очередь, коррелировало с уровнями глицина, аланина и орнитина ($r = 0,47$, $0,45$ и $0,48$ соответственно) (рис. 6).

Высокую корреляцию свободного карнитина (C0) с ацилкарнитином (C2) и бутирилкарнитином (C4) подтверждают результаты корреляционного анализа: $r = 0,46$ и $0,48$ соответственно ($p < 0,001$).

Высокая корреляция между всеми маркерами, входящими в группу длинноцепочечных ацилкарнитинов (C12, C14, C16, C18), позволяет использовать данную группу маркеров комплексно, т. е. в виде единого профиля — коэффициент корреляции между этими маркерами варьировался от $0,69$ до $0,88$ ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей стране внедрением и применением метода хромато-масс-спектрометрии в клинической лабораторной диагностике занимаются более 10 лет, и опубликованные работы отражают практическую значимость применения этого метода для врачей различных специальностей в диагностике различных заболеваний и нозологий, и особенно, наследственных болезней обмена [10, 11]. Опубликованные работы содержат информацию о применении различных разработанных методик качественного и количественного определения маркеров метаболических нарушений для диагностики врожденных и приобретенных нарушений метаболизма, но корреляционный анализ показателей различных групп маркеров не проводился, и разные группы маркеров между собой не сравнивали. В опубликованных работах не проводили анализ массива данных и поиск новых статистически значимых маркеров [12, 13]. В то же время тактику анализа массивов данных сейчас стали активно применять в лабораторной диагностике. Большие объемы выборок позволяют создать на их основе массивы данных, которые дают возможность использовать параметрические критерии, применяемые в разных видах статистического (кластерного, корреляционного) анализа, что служит дополнительным инструментом в поиске новых лабораторных маркеров и оценке их

диагностической эффективности. Было опубликовано несколько статей, где изучение всего массива данных по концентрациям аминокислот и ацилкарнитинов и поиска корреляций между этими группами метаболитов давало дополнительную информацию и позволяло проводить ассоциации и разрабатывать алгоритмы диагностики различных патологий обмена веществ, таких как диабет 2-го типа и метаболический синдром [14, 15]. Так, прогностическая модель, содержащая панель ацилкарнитинов и аминокислот, улучшила классификацию случаев диабета, по сравнению с моделью, содержащей исключительно установленные факторы риска [15]. В то же время исследования по изучению массивов данных по концентрациям аминокислот и ацилкарнитинов в педиатрической популяции не было, данные группы метаболитов всегда рассматривали отдельно друг от друга.

ВЫВОДЫ

Анализ экспериментальных данных показал, что для классических маркеров нарушений метаболизма аминокислот и ацилкарнитинов подтверждена их эффективность в диагностике наследственных болезней обмена. Проведенная статистическая обработка позволила выявить новые маркеры и маркерные профили, которые помогут проводить более тщательную дифференциальную диагностику наследственных болезней обмена веществ. Выявленные взаимосвязи между масс-спектрометрическими показателями разных групп (аминокислот и ацилкарнитинов) имеют потенциальную диагностическую эффективность при обследовании детей на наследственные болезни обмена. Ацилкарнитинный профиль может быть предложен в качестве потенциального дополнительного маркера при пограничных показателях фенилаланина, у пациентов с цитруллинемией и некетолической гиперглицинемией, суммы нормализованных показателей ацилкарнитинов (C12+C16) могут быть предложены в качестве потенциального вторичного маркера фенилкетонурии, а высокая корреляция между всеми маркерами, входящими в группу длинноцепочечных ацилкарнитинов (C12, C14, C16, C18), позволяет использовать данную группу маркеров комплексно, т. е. в виде единого профиля.

Литература

- Colby JM, Thoren KL. Applications of mass spectrometry in the clinical laboratory. In: Clarke W, Marzinke MA. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*. Academic press; 2020, p. 351–63. DOI: 10.1016/B978-0-12-815499-1.00021-1.
- Kilgore MB, Platis D, Lim T, Isenberg S, Pickens CA, Cuthbert C, et al. Development of a universal second-tier newborn screening LC–MS/MS Method for amino acids, lysophosphatidylcholines, and organic acids. *Analytical Chemistry*. 2023; 95 (6): 3187–94. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03098.
- Percenti L, Vickery GNC. Newborn Screening Follow-up. *Med J*. 2019; 80 (1): 37–414. DOI: 10.18043/nmc.80.1.37.
- Chace DH, Kalas T, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003; 49 (11): 1797–817. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022178.
- Mueller P, Schulze A, Schindler I. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clin Chim Acta*. 2003; 327: 47–57. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00327-3.
- Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chrom*. 2001; 758 (1): 27–48. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00100-1.
- Zoppa M, Gallo L, Zacchello F, Giordano G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr*. 2006; 831 (1–2): 267–73. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.12.015.
- Wong HB, Lim GS. Measures of diagnostic accuracy: sensitivity, specificity, PPV and NPV. *Proceedings of Singapore Healthcare*. 2011; 20 (4): 316–8. DOI: 10.1177/201010581102000411.
- Thomas LA. New era predicted for LC-MS in the clinical lab. *Clinical OMICs*. 2016; 3 (9): 12–15.
- Мамедов И. С., Перевезенцев О. А., Золкина И. В., Веденин А. И., Москалева Н. Е., Сухоруков В. С., и др. Быстрая диагностика наследственных болезней обмена веществ у детей. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2010; (3): 57–61.
- Мамедов И. С., Золкина И. В., Сухоруков В. С. Диагностика наследственных болезней метаболизма у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 10: 20–21.
- Мамедов И. С., Сухоруков В. С., Золкина И. В., Савина М. И., Николаева Е. А. Оценка масс-спектрометрических показателей для дифференциальной диагностики наследственных нарушений обмена органических кислот у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019; 64 (1): 61–67.
- Баранова П. В. Органические ацидурии: основные принципы анализа органических кислот методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией: учебно-методическое пособие. М.: Триумф, 2023; 80 с.
- Hananeh T, Solaleh E, Shaghayegh H, Babak A, Negar R, Arezou D-M. The association between acylcarnitine and amino acids profile and metabolic syndrome and its components in Iranian adults. *Frontiers in Endocrinology*. 2023 [cited 2023 Nov 29]; 14: [10 p.]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1058952/full> DOI: 10.3389/fendo.2023.1058952.
- Gunther SH, Khoo CM, Tai E-S, et al. Serum acylcarnitines and amino acids and risk of type 2 diabetes in a multiethnic Asian population. *BMJ Open Diab Res Care*. 2020 [cited 2023 Nov 29]; 8: e001315 [10 p.]. Available from: <https://drc.bmj.com/content/bmjdr/8/1/e001315.full.pdf> DOI: 10.1136/bmjdr-2020-001315.

References

- Colby JM, Thoren KL. Applications of mass spectrometry in the clinical laboratory. In: Clarke W, Marzinke MA. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*. Academic press; 2020, p. 351–63. DOI: 10.1016/B978-0-12-815499-1.00021-1.
- Kilgore MB, Platis D, Lim T, Isenberg S, Pickens CA, Cuthbert C, et al. Development of a universal second-tier newborn screening LC–MS/MS Method for amino acids, lysophosphatidylcholines, and organic acids. *Analytical Chemistry*. 2023; 95 (6): 3187–94. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03098.
- Percenti L, Vickery GNC. Newborn Screening Follow-up. *Med J*. 2019; 80 (1): 37–414. DOI: 10.18043/nmc.80.1.37.
- Chace DH, Kalas T, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003; 49 (11): 1797–817. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022178.
- Mueller P, Schulze A, Schindler I. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clin Chim Acta*. 2003; 327: 47–57. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00327-3.
- Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chrom*. 2001; 758 (1): 27–48. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00100-1.
- Zoppa M, Gallo L, Zacchello F, Giordano G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr*. 2006; 831 (1–2): 267–73. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.12.015.
- Wong HB, Lim GS. Measures of diagnostic accuracy: sensitivity, specificity, PPV and NPV. *Proceedings of Singapore Healthcare*. 2011; 20 (4): 316–8. DOI: 10.1177/201010581102000411.
- Thomas LA. New era predicted for LC-MS in the clinical lab. *Clinical OMICs*. 2016; 3 (9): 12–15.
- Mamedov IS, Perevezencev OA, Zolkina IV, Vedenin AI, Moskaleva NE, Suhorukov VS, i dr. Bystraja diagnostika nasledstvennyh boleznej obmena veshhestv u detej. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2010; (3): 57–61. Russian.
- Mamedov IS, Zolkina IV, Suhorukov VS. Diagnostika nasledstvennyh boleznej metabolizma u detej. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2011; 10: 20–21. Russian.
- Mamedov IS, Suhorukov VS, Zolkina IV, Savina MI, Nikolaeva EA. Ocenka mass-spektrmetricheskikh pokazatelej dlja differencial'noj diagnostiki nasledstvennyh narushenij obmena organicheskikh kislot u detej. *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 2019; 64 (1): 61–67. Russian.
- Baranova PV. Organicheskie acidurii: osnovnye principy analiza organicheskikh kislot metodom gazovoj hromatografii s mass-spektrmetriiej: uchebno-metodicheskoe posobie. M.: Triumf, 2023; 80 s. Russian.
- Hananeh T, Solaleh E, Shaghayegh H, Babak A, Negar R, Arezou D-M. The association between acylcarnitine and amino acids profile and metabolic syndrome and its components in Iranian adults. *Frontiers in Endocrinology*. 2023 [cited 2023 Nov 29]; 14: [10 p.]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1058952/full> DOI: 10.3389/fendo.2023.1058952.
- Gunther SH, Khoo CM, Tai E-S, et al. Serum acylcarnitines and amino acids and risk of type 2 diabetes in a multiethnic Asian population. *BMJ Open Diab Res Care*. 2020 [cited 2023 Nov 29]; 8: e001315 [10 p.]. Available from: <https://drc.bmj.com/content/bmjdr/8/1/e001315.full.pdf> DOI: 10.1136/bmjdr-2020-001315.

ИНФОРМАТИВНОСТЬ СЕНСОРОВ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ NF-κB И AP-1 ПРИ ОЦЕНКЕ ДЕРМАТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ *IN VITRO*

Т. В. Толстова ✉, В. К. Пурецкий, П. М. Кожин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

Для сертификации новых фармацевтических, химических или косметических продуктов необходимо тестирование на токсичность, в том числе дерматотоксичность. Модели *in vitro* исследований считают наиболее перспективными, и ряд таких тестов внедрен в практику сертификационных испытаний. Новые возможности для регистрации раннего ответа клеток на повреждение могут предоставить клеточные сенсоры, основанные на визуальной количественной регистрации изменений активности сигнальных путей, задействованных в реализации такого ответа. NF-κB и AP-1 — два важных фактора транскрипции белков, активность которых возрастает в клетке при повреждении, воспалении и изменении редокс-баланса. Целью исследования было разработать клеточные сенсоры на основе immortalized кератиноцитов человека линии HaCaT, которые экспрессируют зеленый флуоресцентный белок (GFP) при активации сигнальных путей NF-κB (HaCaT/NF-κB) или AP-1 (HaCaT/AP-1), и изучить их информативность при регистрации дозозависимого ответа на воздействие индукторов соответствующих сигнальных путей. Результаты показали, что уровень флуоресценции клеток HaCaT/NF-κB дозозависимо изменялся в $6,05 \pm 0,51$ и $5,53 \pm 0,52$ раз при воздействии TNFα или LPS (в концентрациях от 0 до 80 нг/мл). Биосенсор HaCaT/AP-1 также реагировал на воздействие Cd (NO₂)₂ (в концентрациях от 0 до 40 мкМ) и ультрафиолетового излучения типа А (УФ-А) (от 0 до 40 Дж/см²), однако позволял регистрировать его качественно, но не количественно. Флуоресценция клеток сенсора возрастала в $1,51 \pm 0,24$ и $1,66 \pm 0,43$ раз соответственно. Разработанные клеточные сенсоры могут быть использованы для оценки цитотоксического действия тестируемых веществ на клетки кожи человека *in vitro* и изучения механизмов цитотоксичности.

Ключевые слова: кератиноциты, биосенсор, дерматотоксичность**Финансирование:** работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800481-0).**Вклад авторов:** Т. В. Толстова — проведение эксперимента, сбор, анализ и интерпретация данных, написание статьи, оформление рисунков; В. К. Пурецкий — проведение эксперимента, оформление рисунков; П. М. Кожин — анализ литературы, написание статьи, оформление рисунков; Н. Г. Лузгина — концепция и дизайн работы, написание статьи; А. Л. Русанов — планирование исследования, написание статьи, общее руководство исследованием.✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Викторовна Толстова
ул. Погодинская, д. 10, с. 8, г. Москва, 119121, Россия; tolstova@ibmc.msk.ru**Статья получена:** 11.12.2023 **Статья принята к печати:** 16.02.2024 **Опубликована онлайн:** 27.02.2024**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.007INFORMATION CAPACITY OF THE NF-κB AND AP-1 SIGNALING ACTIVATION SENSORS IN *IN VITRO* ASSESSMENT OF DERMATOTOXIC EFFECTS

Tolstova TV ✉, Pureczky VK, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Toxicity testing, including testing for skin toxicity, is essential for certification of novel pharmaceutical, chemical, and skincare products. The *in vitro* assessment models are considered to be the most promising; a number of such tests have been introduced into practice of approval testing. The new possibilities of detecting the early cellular response to damage can be provided by the cell-based sensors built upon visual quantification of the changes in activity of the signaling pathways involved in realization of such response. NF-κB and AP-1 represent two important protein transcription factors, the increase in activity of which in the cell is associated with damage, inflammation or redox balance alteration. The study was aimed to develop the cell-based sensors built upon the HaCaT immortalized human keratinocyte cell line that express green fluorescent protein (GFP) when the NF-κB (HaCaT/NF-κB) or AP-1 (HaCaT/AP-1) signaling pathway is activated, as well as to assess their information capacity when recording the dose-dependent response to the exposure to inducers of appropriate signaling pathways. The findings showed that the HaCaT/NF-κB cell fluorescence levels changed by 6.05 ± 0.51 and 5.53 ± 0.52 times upon exposure to TNFα or LPS (at a concentration of 0–80 ng/mL) in a dose dependent manner. The HaCaT/AP-1 biosensor also responded to the exposure to Cd (NO₂)₂ (at a concentration of 0–40 μM) and ultraviolet A (UVA) (0–40 J/cm²), however, it enabled qualitative, but not quantitative detection. The sensor cell fluorescence increased by 1.51 ± 0.24 and 1.66 ± 0.43 times, respectively. The cell-based sensors developed can be used to assess cytotoxic effects of the test substances on the human skin cells *in vitro* and study the cytotoxicity mechanisms.

Keywords: keratinocytes, biosensor, skin toxicity**Funding:** the work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (№ 122022800481-0).**Author contribution:** Tolstova TV — experimental procedure, data acquisition, analysis, and interpretation, manuscript writing, illustrations; Pureczky VK — experimental procedure, illustrations; Kozhin PM — literature review, manuscript writing, illustrations; Luzgina NG — study concept and design, manuscript writing; Rusanov AL — study planning, manuscript writing, overall guidance for the study.✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana V. Tolstova
Pogodinskaya, 10, s. 8, Moscow, 119121, Russia; tolstova@ibmc.msk.ru**Received:** 11.12.2023 **Accepted:** 16.02.2024 **Published online:** 27.02.2024**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.007

Одним из ограничений внедрения в оборот новых фармацевтических субстанций, химических веществ и косметической продукции является риск развития повреждений или раздражения кожных покровов. В связи с этим сертификационная оценка безопасности данных

продуктов подразумевает обязательное тестирование на дерматотоксичность.

Известен ряд стандартизованных тестов *in vivo*, одобренных Организацией экономического сотрудничества и развития (OECD) и регламентированных ГОСТ РФ. В

частности, для оценки дерматотоксичности широкое применение нашли протоколы OECD № 429 на основе анализа локальных лимфатических узлов мышей [1], № 406 — максимизационный тест на морских свинках Магнуссона и Клигмана [2], а также Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека, в том числе «Испытания по оценке кожной сенсibilизации» (ГОСТ 32375-2013) [3] и «Определение токсичности при повторном/многократном кожном поступлении. 28/21-дневный тест» (ГОСТ 32642-2014) [4] и др.

Однако исследования неблагоприятных эффектов препаратов с использованием животных приобретают все больше ограничений [5], в то время как тесты *in vitro*, основанные на использовании клеток человека, видоспецифичны, лучше воспроизводимы и обладают достаточной достоверностью [6, 7]. В частности, исследование повреждений и/или раздражений глаз могут быть проведены с использованием реконструированного роговице-подобного эпителия человека (EpiOcular™ (MatTek; США), МСТТ HCE™ (Biosolution; Южная Корея)) [8, 9], а коррозионных свойств — на реконструированном эпидермисе человека (EpiSkin™ (L'Oréal; Франция), epiCS® (Phenion; Германия)) [10, 11].

Одним из этапов исследования биобезопасности тестируемых соединений является оценка цитотоксичности, например, в отношении immortalized кератиноцитов человека HaCaT, с помощью колориметрических или флуориметрических анализов (МТТ-тест, окрашивание аннексином V или трипановым синим) [12]. Однако цитотоксические эффекты могут заключаться не только в изменении метаболической активности или гибели клеток, но и в активации ряда сигнальных путей. Перспективный подход для регистрации цитотоксических эффектов — использование генетически модифицированных клеток, несущих репортерные гены под контролем чувствительных к стрессу промоторов [13–15]. Например, для оценки сенсibilизирующего действия тестируемых веществ на кожу человека активно используют тест KeratinoSens™, который представляет собой клеточную линию, содержащую репортерный ген люциферазы под контролем элемента антиоксидантного ответа — гена *AKR1C2* [16].

Транскрипционные факторы, такие как NF-κB и AP-1, участвуют в клеточном ответе на широкий спектр стимулов: тяжелые металлы, ультрафиолет, цитокины, инфекционные агенты и др., и могут представлять интерес в качестве биомаркеров цитотоксического воздействия [15, 17]. Так, важный транскрипционный фактор NF-κB регулирует транскрипцию белков, участвующих в воспалительном ответе, иммунном ответе, окислительном стрессе, апоптозе. AP-1 играет ключевую роль в пролиферации, дифференцировке, старении и гибели клеток. Флуоресцентный биосенсор на основе линии преадипоцитов 3T3-L1, стабильно экспрессирующий GFP при активации пути NF-κB, ранее был использован для регистрации противовоспалительных эффектов антиоксидантов растительного происхождения [18]. Разработанная ранее клеточная модель стенки тонкого кишечника человека на основе клеток линии Caco-2 обеспечивала дозозависимую регистрацию активации транскрипционного фактора NF-κB под действием кадмия [15]. Клеточный биосенсор на основе HT-29 с регуляторным элементом для транскрипционного фактора AP-1 и геном, кодирующим флуоресцентный белок mCherry, успешно применяли для скрининга токсичности тяжелых металлов [17]. Однако клеточные сенсоры, регистрирующие

активацию сигнальных путей NF-κB и AP-1, при оценке дерматотоксических эффектов в тестах *in vitro* ранее не исследовали.

Цель исследования — разработать клеточные сенсоры на основе immortalized кератиноцитов человека линии HaCaT, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP) при активации сигнальных путей NF-κB (HaCaT/NF-κB) или AP-1 (HaCaT/AP-1) и изучить их информативность при регистрации дозозависимого повреждения клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трансдукция клеточной линии HaCaT лентивирусной конструкцией с регуляторными элементами для транскрипционных факторов NF-κB/AP-1 и геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок

Культирование клеток HaCaT (CLS Cell Lines Service, 300493; Германия) проводили в питательной среде DMEM/F12 (Gibco; США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США), 0,1% GlutaMAX™ и пенициллина/стрептомицина в объеме 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно (Gibco; США) в CO₂-инкубаторе (MCO-20AIC Sanyo; Япония) при температуре 37 ± 1 °C, влажности 90 ± 10% и концентрации CO₂ 5,0 ± 1,0%. Замену питательной среды производили каждые 48 ч. По достижении 80% конfluence, клетки диссоциировали 0,25%-м раствором трипсин-ЭДТА («Пан-Эко»; Россия) и ресуспендировали в свежей культуральной среде.

Трансдукцию клеток проводили с помощью наборов Signal Lenti Reporter Assay (QIAGEN; США), содержащих лентивирусные частицы с индуцируемым NF-κB/AP-1 GFP-репортером. Концентрация лентивирусных частиц составляла 2 × 10⁷ частиц/мл. Для проведения трансдукции клетки высевали в количестве 4 × 10⁴ клеток на лунку в 24-луночный планшет (Corning; США) и инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе (MCO-20AIC; Sanyo, Япония).

Через 18 ч среду отбирали, добавляли лентивирусные частицы в объеме 80 мкл, что соответствовало множественности трансфекции 40, и 6 мкл SureENTRY Transduction Reagent (QIAGEN; США) для улучшения эффективности трансфекции. Общий объем раствора доводили до 600 мкл. Инкубировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе (MCO-20AIC; Sanyo, Япония). В контрольной лунке среду заменяли на 600 мкл полной культуральной среды. После этого среду с лентивирусными частицами заменяли на DMEM/F12 (Gibco; США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США), пенициллина/стрептомицина в объеме 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно и 0,1% GlutaMAX (Gibco; США).

Селекция трансдуцированных клеток с GFP-репортером, индуцируемым NF-κB и AP-1

Для селекции использовали антибиотик пурамицин (InvivoGen; США), к которому были устойчивы трансдуцированные клетки. Для оценки устойчивости нетрансдуцированных клеток HaCaT (дикого типа) к пурамицину применяли МТТ-тест. Для этого клетки высаживали в 96-луночные планшеты (Corning; США) по 2 × 10³ клеток в 200 мкл среды на лунку в DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и GlutaMAX (Gibco; США). Затем вносили 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 и 8,0 мкг/мл пурамицина и культивировали клетки в течение

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Последовательность праймера 1 (Forward)	Последовательность праймера 2 (Reverse)
<i>GAPDH</i>	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT	ACCAAAATCCGTTGACTCCGACCTT
<i>NFKB1</i>	CATGGCAGACGATGATCCC	ATTTGAAGGTATGGGCCAT
<i>RelA</i>	CTGTCTTTCTCATCCCATCTT	TCCTCTTTCTGCACCTTGTC
<i>C-JUN</i>	ATGGTCAGTTATACTCCTCCTC	CCTCCTGAAACATCGCACTATC

10 дней, заменяя среду в лунках каждые 96 ч. Ежедневно исследовали клетки с помощью фазово-контрастного светового микроскопа Primovert (Carl Zeiss; Германия).

По истечении срока воздействия отбирали из лунок питательную среду с пуромицином (опыт) или питательную среду (контроль), промывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,4 (PBS; «ПанЭко», Россия) и добавляли 200 мкл свежей полной питательной среды, содержащей 0,5 мг/мл МТТ. Инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo; Япония) при температуре 37 °C и 5% CO₂. Затем отбирали среду, промывали 200 мкл PBS и добавляли в каждую лунку 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО; Helicon, Россия). После 15 мин перемешивания на шейкере (150–200 об./мин, в темноте) измеряли оптическую плотность растворов на длине волны 595 нм (за вычетом фонового поглощения на длине волны 655 нм) с помощью планшетного спектрофотометра iMark (BioRad; США). Жизнеспособность определяли по формуле:

$$\frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} = 100\%,$$

где ОП — оптическая плотность.

Сортировка трансдуцированных клеток с GFP-репортером, индуцируемым NF-κB и AP-1

Для сортировки полученные после селекции популяции трансдуцированных клеток рассаживали на чашку Петри

диаметром 100 мм (Corning; США) или культуральный матрас T75 (Corning; США) в концентрации 4 × 10⁵ клеток на чашку. При достижении 70–80% конфлюэнта заменяли среду на содержащую активатор сигнального пути NF-κB — 20 нг/мл фактора некроза опухоли альфа (TNFα) (чистота > 95%; Elabscience, Китай) или AP-1 — Cd(NO₃)₂ в концентрации 10 мкМ. Через 24 ч инкубации клетки обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина-ЭДТА, осаждали при 300 g 5 мин и ресуспендировали в 1 мл свежей питательной среды для последующей сортировки GFP-положительных клеток.

Сортировку GFP-положительных клеток проводили при помощи клеточного сортера BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences; США). Анализируемую клеточную популяцию определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния для исключения дребеса и дуплетов. В качестве негативного контроля (контроля автофлуоресценции) использовали нетрансдуцированные клетки. В результате сортировки получали трансдуцированные клеточные линии с максимальным уровнем флуоресцентного белка в ответ на индукцию.

Исследование дозозависимого изменения интенсивности флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT при активации путей NF-κB/AP-1

Трансдуцированные клетки HaCaT высевали в 96-луночный планшет по 7 × 10³ клеток на каждую лунку, затем инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе

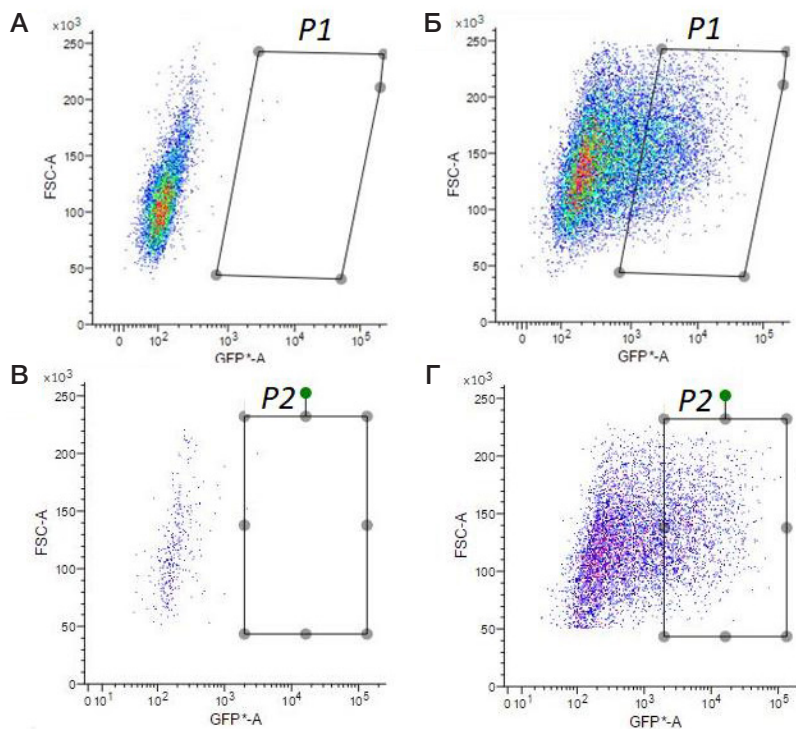


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции трансдуцированных клеток: контрольные клетки (А, В) и трансдуцированные клетки с высокой интенсивностью флуоресценции (Б, Г) в ответ на стимуляцию 20 нг/мл TNFα для HaCaT/NF-κB (гейт P1) и 10 мкМ Cd(NO₃)₂ для HaCaT/AP-1 (гейт P2) в течение 24 ч

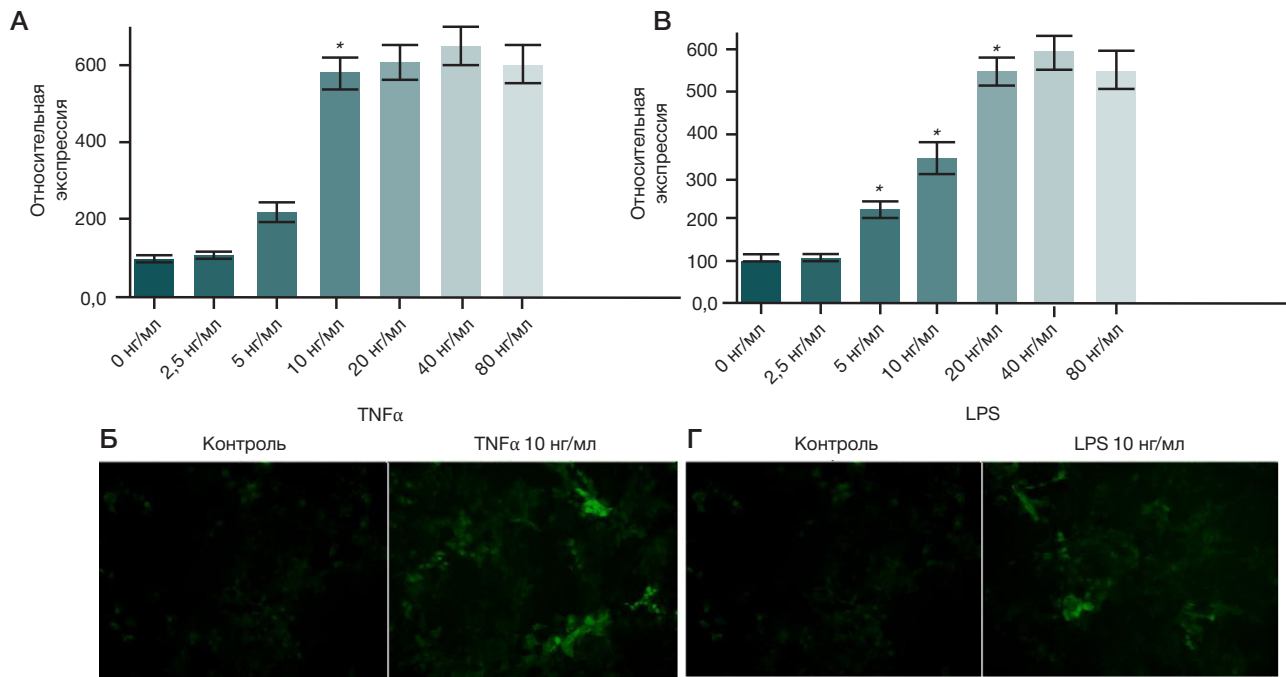


Рис. 2. Изменение относительной флуоресценции клеток линии HaCaT/NF-κB при воздействии TNFα (А, Б) и LPS (В, Г). Результаты флуориметрии (А, В) и флуоресцентная микроскопия (Б, Г). * — статистически значимые отличия от предыдущей концентрации, $p < 0,05$

MCO-20AIC (Sanyo; Япония) при температуре 37 °C. К клеткам добавляли различные концентрации тестовых веществ: TNFα и липополисахарид (LPS) (чистота ≥ 99%; Servicebio, Китай) — для активации NF-κB; Cd(NO₃)₂ — для активации AP-1. Было также исследовано влияние ультрафиолетового излучения (УФ-А) с длиной волны 365 нм на уровень флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT/AP-1. Интенсивность флуоресценции фиксировали на многофункциональном ридере Infinite M200 (Tecan; Швейцария) с длинами волн возбуждения 477 нм и эмиссии 507 нм для флуоресценции и длиной волны 600 нм для абсорбции. Вычисляли среднюю интенсивность флуоресценции в клетках (за вычетом средней интенсивности флуоресценции фона без клеток) по отношению к контрольным клеткам без индукторов (100%). Микрофотографии биосенсора в интактном и активированном состояниях были получены на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad; США). Полученные фотографии обрабатывали с помощью графической программы ImageJ (NIH; США).

Анализ экспрессии целевых генов методом полимеразной цепной реакции

Полученные результаты измерения интенсивности флуоресценции сравнивали с результатами исследования экспрессии генов, полученных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, различных субъединиц белка NF-κB (*RelA* — субъединица p65; *NFKB1* — субъединица p50) и AP-1 (*C-JUN*). Для этого выделяли РНК (с использованием набора для выделения РНК на колонках «Биолабмикс»; Россия) согласно протоколу производителя и измеряли ее количество на приборе NanoDrop 2000c (Thermo Scientific; США). Реакцию обратной транскрипции с 1 мкг РНК проводили с помощью MMLV RT kit («Евроген»; Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР осуществляли с помощью qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»; Россия). Праймеры представлены в табл. 1. В качестве референсного гена использовали *GAPDH*.

Анализ данных

Полученные результаты обрабатывали с помощью языка программирования для статистической обработки данных R. Различия между группами определяли с помощью *t*-критерия с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественное сравнение. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансдукция, селекция и сортировка клеток HaCaT

Клетки HaCaT были трансдуцированы с использованием лентивирусной конструкции Signal Lenti Reporter Assay (QIAGEN; США), содержащей лентивирусные частицы с индуцируемым NF-κB/AP-1 GFP-репортером. В результате оценки цитотоксического действия пуромидина с помощью МТТ-теста была выбрана рабочая концентрация антибиотика (минимальная концентрация, вызывающая полную гибель исходных клеток) для селекции трансдуцированных клеток, соответствующая 1000 нг/мл. Селекцию проводили в течение 10 дней, заменяя культуральную среду каждые 3 дня.

На следующем этапе мы проводили сортировку трансдуцированных клеток после активации с помощью 20 нг/мл TNFα для HaCaT/NF-κB и 10 мкМ Cd(NO₃)₂ для HaCaT/AP-1 в течение 24 ч. В результате активации соответствующих сигнальных путей функциональные трансдуцированные клетки начинают вырабатывать GFP, что было зафиксировано с помощью проточной цитометрии. Сортировку GFP-положительных клеток проводили при помощи клеточного сортера BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences; США). Анализируемую клеточную популяцию определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния для исключения дебриса и дуплетов (рис. 1). В качестве негативного контроля (контроля автофлуоресценции) использовали нетрансдуцированные

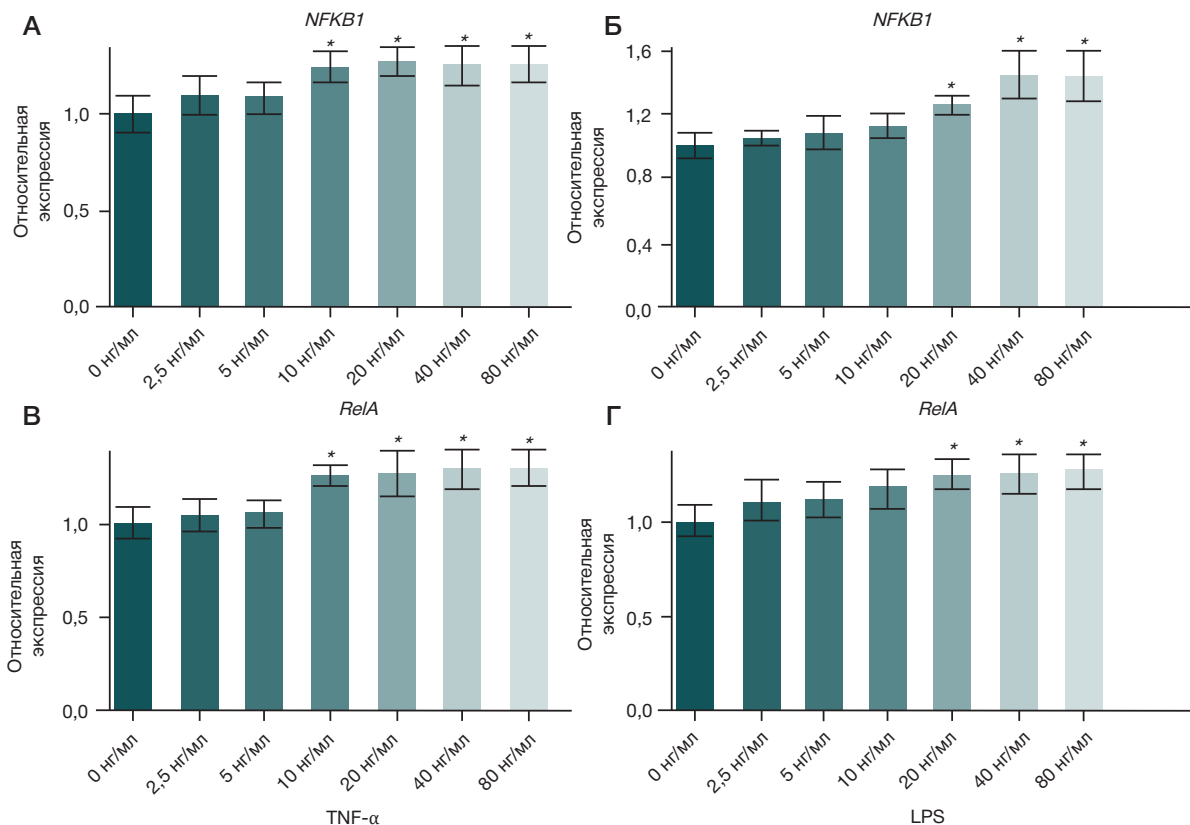


Рис. 3. Оценка активации генов субъединиц транскрипционного фактора NF-κB. Относительная экспрессия мРНК генов *RelA* и *NFKB1* под воздействием TNFα (А, Б) и LPS (В, Г). * — статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0,05$

клетки (рис. 1А, В). Трансдуцированные клеточные линии с максимальным уровнем флуоресценции в ответ на индукцию (гейт *P1*, рис. 1Б; гейт *P2*, рис. 1Г) были отобраны для последующего анализа работы биосенсора.

Исследование дозозависимого изменения интенсивности флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT при активации пути NF-κB с использованием TNFα и LPS

Полученные в результате селекции и последующей сортировки клетки линии HaCaT, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, содержащей GFP-репортер, индуцируемый NF-κB, исследовали на дозозависимое изменение интенсивности флуоресценции методом флуориметрии с использованием различных концентраций известных индукторов данного сигнального пути — TNFα и LPS (далее — индукторы). К трансдуцированным клеткам добавляли различные концентрации индукторов, после чего фиксировали интенсивность флуоресценции клеток сенсора на многофункциональном ридере Infinite M200 (Tecan; Швейцария) и исследовали микрофотографии, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad; США). Так, для активации NF-κB к клеткам вводили TNFα и LPS в концентрациях 0–80 нг/мл для обоих веществ. В результате инкубации с индукторами фиксировали изменение интенсивности флуоресценции (рис. 2). Кроме того, при воздействии TNFα уже в концентрации 5 нг/мл по появлению флуоресцирующих в зеленой области спектра клеток фиксировали активацию сигнального пути NF-κB. При увеличении концентрации TNFα вплоть до 10 нг/мл увеличивались интенсивность флуоресценции и количество флуоресцирующих клеток (рис. 2А, Б).

При воздействии LPS достоверное увеличение интенсивности флуоресценции и, соответственно, активация сигнального пути NF-κB также выявлены при минимальной исследуемой концентрации 5 нг/мл. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации обоих использованных индукторов выходила на плато при концентрации выше 20 нг/мл (рис. 2В, Г).

Полученные данные измерения интенсивности флуоресценции сравнивали с результатами исследования экспрессии генов различных субъединиц белка NF-κB (*RelA* — субъединица p65; *NFKB1* — субъединица p50) (рис. 3). Показано, что воздействие TNFα приводит к увеличению экспрессии мРНК генов *RelA* и *NFKB1*, но статистически значимые различия по сравнению с контролем были получены только для концентрации 10 нг/мл, без дальнейшего роста экспрессии (рис. 3А). При воздействии LPS (рис. 3Б) обнаружена аналогичная тенденция: статистически значимое увеличение экспрессии мРНК генов *RelA* и *NFKB1* происходило только при воздействии LPS в концентрации 20 нг/мл без статистически значимого изменения экспрессии при дальнейшем увеличении концентрации.

Исследование дозозависимого изменения интенсивности флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT при активации пути AP-1

Для оценки информативности клеточного сенсора, позволяющего фиксировать активность сигнального пути AP-1, мы использовали индукторы, вызывающие нарушение редокс-баланса клеток — Cd(NO₃)₂ и УФ-А. Мы фиксировали зависимость интенсивности флуоресценции биосенсора от концентрации Cd(NO₃)₂ или интенсивности излучения (рис. 4; табл. 2). Полученные данные об активации

Таблица 2. Изменение флуоресценции клеток линии HaCaT/AP-1 под воздействием Cd(NO₃)₂

Cd(NO ₃) ₂ , мкМ	Относительная интенсивность флуоресценции, %	УФ-А, Дж/см ²	Относительная интенсивность флуоресценции, %
0	100 ± 13	0	100 ± 16
5	115 ± 18	6	135 ± 18
10	121 ± 16	12	168 ± 21*
20	172 ± 49*	18	151 ± 24*
40	166 ± 43*		

Примечание: * — статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0,05$.

пути AP-1 сравнивали с результатами исследования экспрессии гена *C-JUN*, кодирующего субъединицу белка AP-1.

Показано, что воздействие Cd(NO₃)₂ приводит к увеличению флуоресценции клеток HaCaT/AP-1 при концентрации 20 мкМ до 40 мкМ. Однако изменение флуоресценции не было дозозависимым. Вероятно, при увеличении концентрации Cd(NO₃)₂ проявлялись цитотоксические эффекты данного индуктора, что приводило к снижению количества жизнеспособных флуоресцирующих клеток. При этом экспрессия мРНК *C-JUN* повышалась уже при воздействии 5 мкМ, однако не зависела от дозы воздействия при увеличении концентрации (табл. 2; рис. 4А).

Также исследовали ответ клеток сенсора на 24-часовое воздействие различных доз УФ-излучения с длиной волны 365 нм. Полученные результаты измерения интенсивности флуоресценции также сравнивали с результатами исследования экспрессии гена *C-JUN*, кодирующего субъединицу белка AP-1. Значительное увеличение интенсивности флуоресценции клеток сенсора наблюдали при дозе воздействия УФ в дозе 12–18 Дж/см² (достоверно в сравнении с клетками контроля). Интенсивность флуоресценции значимо отличается от контроля при увеличении дозы воздействия вплоть до 18 Дж (табл. 2; рис. 4Б). В то же время увеличение экспрессии мРНК гена *C-JUN* наблюдали при воздействии на клетки исследованных доз УФ-А. Однако изменения не носили дозозависимый характер.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка тестов *in vitro* для оценки биобезопасности химических соединений (ХС) является актуальной задачей,

поскольку исследования на животных приобретают все больше ограничений в последнее время [5, 19]. Поскольку кератиноциты первыми сталкиваются с повреждающими агентами и участвуют в иммунном ответе, они представляют собой перспективную модель для скрининга дерматологических эффектов. При этом линия иммортализованных кератиноцитов HaCaT представляет собой удобную альтернативу первичным клеткам для токсикологических исследований *in vitro* [12]. Так, клетки линии HaCaT демонстрируют нормальный морфогенез и экспрессируют все основные поверхностные маркеры первичных кератиноцитов, а также могут быть дифференцированы при стимуляции и экспрессируют специфические маркеры дифференцировки, такие как кератин 14, кератин 10 и инволюкрин, при этом могут переключаться между дифференцированным и базальным состоянием путем изменения концентрации Ca²⁺ в культуральной среде [20, 21]. Однако при использовании линии клеток HaCaT важно принимать во внимание наличие GOF (от англ. gain-of-function) мутаций в гене *TP53*, которые приводят к повышенной скорости пролиферации и нарушениям терминальной стадии дифференцировки [22]. Тем не менее, клетки HaCaT не требуют наличия в среде культивирования факторов роста и/или дифференцировки, обладают неограниченным потенциалом пролиферации и демонстрируют стабильный фенотип независимо от количества пассажей, в отличие от первичных кератиноцитов [23]. Таким образом, клетки линии HaCaT являются перспективной экспериментальной моделью для исследования различных физиологических процессов, происходящих в кератиноцитах человека, в том числе при анализе токсикологических эффектов ХС.

При разработке тест-систем для идентификации раздражения считается перспективным обеспечение

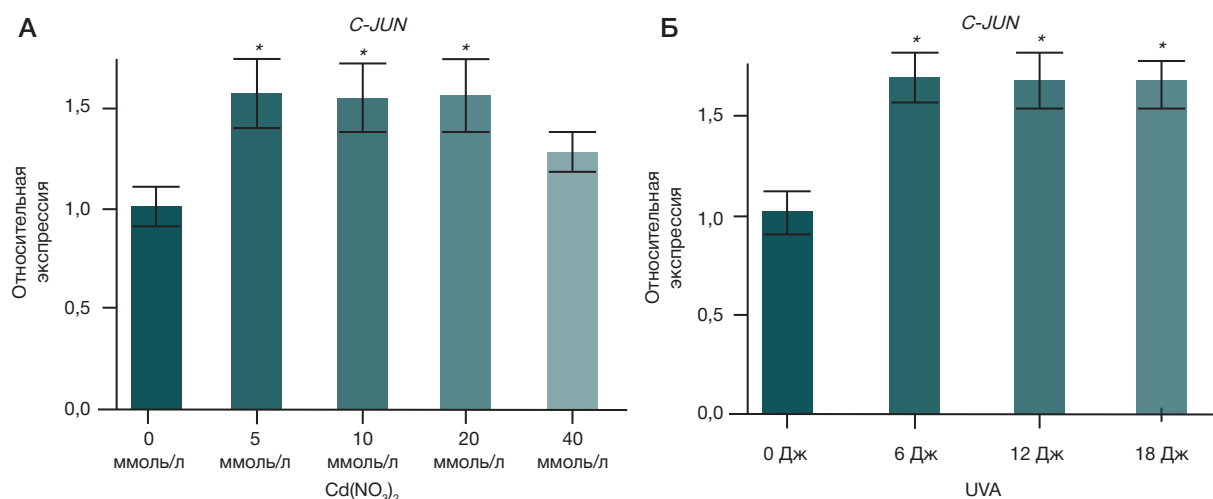


Рис. 4. Оценка активации гена субъединицы транскрипционного фактора AP-1. Относительная экспрессия мРНК гена *C-JUN* под воздействием Cd(NO₃)₂ (А) и УФ-А (Б). * — статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0,05$

возможности анализа конкретных биомаркеров, ассоциированных с повреждением [6, 24]. Это позволяет делать заключение не только о степени потенциальной цитотоксичности тестируемого вещества, но и о молекулярных механизмах ее реализации.

В настоящее время в центре внимания находятся те подходы, которые направлены на изучение ранней реакции клеток на повреждение, предпочтительно с помощью мониторинга в реальном времени. Такие подходы представляют собой перспективную альтернативу стандартным измерениям конечного эффекта воздействия, например, основанных на обнаружении специфических метаболических процессов с помощью колориметрических или флуориметрических анализов (МТТ-тест, окрашивание трипановым синим и др.). Так, на сегодняшний день известны тесты, например, STACK (от англ. *scalable time-lapse analysis of cell death kinetics*), позволяющие выполнять высокопроизводительный анализ динамики процесса повреждения клеток в реальном времени [25]. В частности, флуоресценцию используют для идентификации популяций живых и мертвых клеток с помощью флуоресцентной микроскопии и тщательной оптимизации процедур анализа изображений. Однако цитотоксические эффекты могут не только включать в себя гибель клеток, но и быть связанными с развитием кожной сенсibilизации, одним из ключевых событий формирования которой, согласно OECD-сертифицированным тестам, является активация специфических сигнальных путей в кератиноцитах (например, Keap1/Nrf2-ARE, NF-κB и др.) [26].

Для оценки потенциального повреждающего действия тестируемых веществ в тестах клеточного ответа при оценке их потенциальной биобезопасности на молекулярно-биологическом уровне, в данной работе были разработаны клеточные сенсоры на основе immortalized кератиноцитов человека HaCaT с регуляторными элементами для транскрипционных факторов NF-κB и AP-1 и геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок GFP. В результате доставки данных генетических конструкций клетки вырабатывали GFP при активации соответствующего сигнального пути. При этом интенсивность флуоресценции измеряли количественно. Несмотря на то что пик экспрессии белка GFP в клетках достигается через 24 ч с момента события, детектируемого с его помощью, динамика экспрессии GFP в клетках хорошо известна и точно описана. В этой связи клеточные сенсоры на основе GFP позволяют оценивать динамику клеточного ответа на тестируемое воздействие. При этом необходимо учитывать отсроченный эффект появления флуоресценции и самого клеточного события [15].

Несмотря на то что транскрипционные факторы NF-κB и AP-1 являются одними из наиболее частых участников реализации процессов повреждения клеток на молекулярном уровне, проведенный экспериментальный анализ показал различные возможности разработанных сенсоров HaCaT/NF-κB и HaCaT/AP-1 в регистрации дозозависимых эффектов известных индукторов соответствующих сигнальных путей в клетках. Полученный клеточный сенсор с репортерной конструкцией,

ассоциированной с активацией NF-κB, продемонстрировал возможность чувствительной дозозависимой регистрации активности данного сигнального пути в модельных клетках эпидермиса человека в тесте *in vitro*. Уровень экспрессии GFP-белка биосенсорной конструкции, ассоциированной с активацией сигнального пути NF-κB, измеренный с помощью флуориметрии, хорошо коррелировал с изменением экспрессии целевых мРНК, измеренных методом ПЦР в реальном времени. В свою очередь, клеточный сенсор HaCaT/AP-1 позволял зафиксировать факт активации индукторами соответствующего сигнального пути, однако регистрация дозозависимых эффектов индукторов оказалась невозможной.

Также следует обратить внимание, что информативность результатов тестирования с использованием обоих сенсоров снижалась по мере увеличения концентрации использованных индукторов. Это, вероятно, связано со значительным снижением количества жизнеспособных клеток сенсора в данных условиях, что не позволяет корректно оценивать результаты измерения флуоресценции. В этой связи до проведения тестов с использованием сенсоров HaCaT/NF-κB и HaCaT/AP-1 целесообразно провести МТТ-тест или иной аналогичный тест, позволяющий установить концентрации тестируемых веществ, приводящие к гибели клеток сенсора. Это позволит более корректно оценивать ранние события в клетках в ответ на действие тестируемых веществ, в том числе субтоксического характера.

ВЫВОДЫ

В данной работе разработаны биосенсоры на основе immortalized кератиноцитов HaCaT, содержащих генетические системы активации флуоресцентного белка-репортера GFP, экспрессия которого дозозависимо возрастает при активации сигнальных путей AP-1 и NF-κB, ассоциированных с повреждением клеток эпидермиса человека. Проведено экспериментальное определение чувствительности разработанных биосенсоров. Исследована возможность количественной регистрации интенсивности активации клеток сенсоров в ответ на воздействие индукторов. Установлено, что изменение флуоресценции HaCaT/NF-κB наблюдается при воздействии низких концентраций TNFα или LPS, что согласуется с изменением экспрессии генов *RelA* и *NFKB1*, и имеет дозозависимый характер. Клетки с биосенсором HaCaT/AP-1 также реагируют на воздействие Cd(NO₃)₂ и УФ-А увеличением интенсивности флуоресценции и экспрессии целевых генов, однако зафиксировать дозозависимые эффекты данных индукторов на клетки сенсора не удалось. Разработанные клеточные сенсоры могут найти применение в области оценки цитотоксических эффектов тестируемых веществ на клетки кожи человека в тестах *in vitro*, а также в фундаментальных исследованиях механизмов цитотоксичности. При этом сенсор HaCaT/NF-κB представляется наиболее перспективным с точки зрения возможности регистрации дозозависимых эффектов повреждающих веществ.

Литература

1. OECD, Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2010. Accessed: Dec. 07, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en.
2. OECD, Test No. 406: Skin Sensitisation. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.
3. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсibilизации: ГОСТ 32375-2013. Введ. 01-08-2014. М.: Изд-во стандартов, 2014.
4. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном накожном поступлении. 28/21-дневный тест. ГОСТ 32642-2014. Введ. 01-08-2014. М.: Изд-во стандартов, 2014.
5. Caloni F, De Angelis I, Hartung T. Replacement of animal testing by integrated approaches to testing and assessment (IATA): a call for in vivitrosi. Arch Toxicol. 2022; 96 (7): 1935–1950. DOI: 10.1007/s00204-022-03299-x.
6. Test Methods, PETA Science Consortium International e.V. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <https://www.thepsci.eu/test-methods/>.
7. Bergmann MM, Caubet J-C. Role of in vivo and in vitro Tests in the Diagnosis of Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCAR) to Drug. Curr Pharm Des. 2019; 25 (36): 3872–80. DOI: 10.2174/1381612825666191107104126.
8. OECD, Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2023. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-492-reconstructed-human-cornea-like-epithelium-rhce-test-method-for-identifying-chemicals-not-requiring-classification-and-labelling-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264242548-en.
9. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Методы испытаний с применением реконструированного рогового эпителия человека (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз. ГОСТ 34735-2021. Введ. 01.05.2024. М.: Изд-во стандартов, 2021.
10. OECD, Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2019. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_9789264264618-en.
11. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Разъедание кожи in vitro. Методы с использованием реконструированного человеческого эпидермиса. ГОСТ 32634-2020. Введ. 01.07.2021. М.: Стандартинформ, 2021.
12. Русанов А. Л., Лузгина Н. Г., Лисица А. В. Цитотоксичность додецилсульфата натрия в отношении кератиноцитов линии HaCaT: сравнительный анализ различных методов оценки жизнеспособности клеток. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017; 163 (2): 256–60.
13. Арсланбаева Л. Р., Жердева В. В., Ивашина Т. В., Винокуров Л. М., Русанов А. Л., Савицкий А. П. Генетически кодируемая Fret-пара на основе тербийсвязывающего пептида и красного флуоресцентного белка. Прикладная биохимия и микробиология. 2010; 46 (2): 166–71.
14. Rusanov AL, Savitsky AP. Fluorescence resonance energy transfer between fluorescent proteins as powerful toolkits for in vivo studies. Laser Physics Letters. 2011; 8 (2): 91–102. DOI: 10.1002/lapl.201010107.
15. Русанов А. Л., Лузгина Е. Д., Вахрушев И. В., Наход К. В., Лузгина Н. Г. Клеточная модель стенки тонкого кишечника человека на основе генетически модифицированных клеток линии Caco-2. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2018; 3: 201–4.
16. Emter R, van der Veen JW, Adamson G, Ezendam J, van Loveren H, Natsch A. Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol In Vitro. 2013; 27 (8): 2225–32. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.09.009.
17. Guo H, Ji J, Sun J, Zhang Y, Sun X. Development of a living mammalian cell-based biosensor for the monitoring and evaluation of synergetic toxicity of cadmium and deoxynivalenol. Science of the Total Environment. 2021; 771: 144823. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144823.
18. Shen Q, et al. Adipocyte reporter assays: Application for identification of anti-inflammatory and antioxidant properties of mangostin xanthenes. Mol Nutr Food Res. 2014; 58 (2): 239–47. DOI: 10.1002/mnfr.201300181.
19. Buchanan V. H.R.2565 — 117th Congress (2021-2022): FDA Modernization Act of 2021. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <http://www.congress.gov/bills/117th-congress/house-bill/2565>.
20. Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. Cytotechnology. 2007; 54 (2): 77–83. DOI: 10.1007/s10616-007-9076-1.
21. Micallef L, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. Exp Dermatol. 2009; 18 (2): 143–51. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x.
22. Rusanov AL, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. Data. 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
23. Rusanov AL, Romashin DD, Zgoda VG, Butkova TV, Luzgina NG. Protein dataset of immortalized keratinocyte HaCaT cells and normal human keratinocytes. Data in Brief. 2021; 35: 106871. DOI: 10.1016/j.dib.2021.106871.
24. Sergachev I, Rusanov A, Trushkin E, Sakharov D, Marx U, Tonevitsky A. Fluorescent optical fiber sensors for cell viability monitoring. Analyst. 2013; 138 (14): 4066–9. DOI: 10.1039/c3an00248a.
25. Forcina GC, Conlon M, Wells A, Cao JY, Dixon SJ. Systematic quantification of population cell death kinetics in mammalian cells. Cell Syst. 2017; 4 (6): 600–10. DOI: 10.1016/j.cels.2017.05.002.
26. OECD, Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en.

References

1. OECD, Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2010. Accessed: Dec. 07, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en.
2. OECD, Test No. 406: Skin Sensitisation. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.
3. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсibilизации: ГОСТ 32375-2013. Введ. 01-08-2014. М.: Изд-во стандартов, 2014. Russian.
4. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном накожном поступлении. 28/21-дневный тест.

- GOST 32642-2014. Vved. 01-08-2014. M.: Izd-vo standartov, 2014. Russian.
5. Caloni F, De Angelis I, Hartung T. Replacement of animal testing by integrated approaches to testing and assessment (IATA): a call for in vitro. *Arch Toxicol.* 2022; 96 (7): 1935–1950. DOI: 10.1007/s00204-022-03299-x.
 6. Test Methods, PETA Science Consortium International e.V. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <https://www.thepsci.eu/test-methods/>.
 7. Bergmann MM, Caubet J-C. Role of in vivo and in vitro Tests in the Diagnosis of Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCAR) to Drug. *Curr Pharm Des.* 2019; 25 (36): 3872–80. DOI: 10.2174/1381612825666191107104126.
 8. OECD, Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2023. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-492-reconstructed-human-cornea-like-epithelium-rhce-test-method-for-identifying-chemicals-not-requiring-classification-and-labelling-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264242548-en.
 9. Metody ispytaniy po vozdeystviyu himicheskoy produkcii na organizm cheloveka. Metody ispytaniy s primeneniem rekonstruirovannogo rogovogo jepitelija cheloveka (RhCE) dlja opredelenija himicheskoy produkcii, ne trebujushhej klassifikacii opasnosti kak vyzyvajushhej razdrashenie ili ser'eznoe povrezhdenie glaz. GOST 34735-2021. Vved. 01.05.2024. M.: Izd-vo standartov, 2021. Russian.
 10. OECD, Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2019. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_9789264264618-en.
 11. Metody ispytaniy po vozdeystviyu himicheskoy produkcii na organizm cheloveka. Raz'edanie kozhi in vitro. Metody s ispol'zovaniem rekonstruirovannogo chelovecheskogo jepidermisa. GOST 32634-2020. Vved. 01.07.2021. M.: Standartinform, 2021. Russian.
 12. Rusanov AL, Luzgina NG, Lisica AV. Citotoksichnost' dodecilsul'fata natrija v otnoshenii keratinocitov linii HaCaT: sravnitel'nyj analiz razlichnyh metodov ocenki zhiznesposobnosti kletok. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2017; 163 (2): 256–60. Russian.
 13. Arslanbaeva LR, Zherdeva VV, Ivashina TV, Vinokurov LM, Rusanov AL, Savickij AP. Geneticheski kodiruemaja Fret-para na osnove terbijsvjazyvajushhego peptida i krasnogo fluorescentnogo belka. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija.* 2010; 46 (2): 166–71. Russian.
 14. Rusanov AL, Savitsky AP. Fluorescence resonance energy transfer between fluorescent proteins as powerful toolkits for in vivo studies. *Laser Physics Letters.* 2011; 8 (2): 91–102. DOI: 10.1002/lapl.201010107.
 15. Rusanov AL, Luzgina ED, Vahrushev IV, Nahod KV, Luzgina NG. Kletochnaja model' stenki tonkogo kishechnika cheloveka na osnove geneticheski modifitsirovannyh kletok linii Saco-2. *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine.* 2018; 3: 201–4. Russian.
 16. Emter R, van der Veen JW, Adamson G, Ezendam J, van Loveren H, Natsch A. Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol In Vitro.* 2013; 27 (8): 2225–32. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.09.009.
 17. Guo H, Ji J, Sun J, Zhang Y, Sun X. Development of a living mammalian cell-based biosensor for the monitoring and evaluation of synergetic toxicity of cadmium and deoxynivalenol. *Science of the Total Environment.* 2021; 771: 144823. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144823.
 18. Shen Q, et al. Adipocyte reporter assays: Application for identification of anti-inflammatory and antioxidant properties of mangostin xanthenes. *Mol Nutr Food Res.* 2014; 58 (2): 239–47. DOI: 10.1002/mnfr.201300181.
 19. Buchanan V. H.R.2565 — 117th Congress (2021-2022): FDA Modernization Act of 2021. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <http://www.congress.gov/bill/117th-congress/house-bill/2565>.
 20. Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology.* 2007; 54 (2): 77–83. DOI: 10.1007/s10616-007-9076-1.
 21. Micallef L, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2009; 18 (2): 143–51. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x.
 22. Rusanov AL, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. *Data.* 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
 23. Rusanov AL, Romashin DD, Zgoda VG, Butkova TV, Luzgina NG. Protein dataset of immortalized keratinocyte HaCaT cells and normal human keratinocytes. *Data in Brief.* 2021; 35: 106871. DOI: 10.1016/j.dib.2021.106871.
 24. Sergachev I, Rusanov A, Trushkin E, Sakharov D, Marx U, Tonevitsky A. Fluorescent optical fiber sensors for cell viability monitoring. *Analyst.* 2013; 138 (14): 4066–9. DOI: 10.1039/c3an00248a.
 25. Forcina GC, Conlon M, Wells A, Cao JY, Dixon SJ. Systematic quantification of population cell death kinetics in mammalian cells. *Cell Syst.* 2017; 4 (6): 600–10. DOI: 10.1016/j.cels.2017.05.002.
 26. OECD, Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en.

СРАВНЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В АСТРОЦИТОМАХ ПО МЕРЕ РОСТА ИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОСТИ

С. И. Пеков^{1,2,3}, К. В. Бочаров^{2,4}, Д. С. Бормотов², В. А. Елиферов², Е. В. Парочкина², А. А. Сорокин², Е. Н. Николаев¹, И. А. Попов^{2,3}✉

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

⁴ Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н. Н. Семенова, Москва, Россия

Применение методов прямой масс-спектрометрии является одним из перспективных подходов к улучшению полноты резекции глиальных опухолей за счет использования дополнительного способа повышения точности определения границ опухоли непосредственно в ходе нейрохирургического вмешательства. Массивы данных, накапливаемые в ходе апробации подобных технологий, могут быть использованы и для проведения фундаментальных исследований с целью выявления метаболических изменений, сопровождающих рост опухоли. Целью работы было провести анализ изменений в липидном составе клеточных мембран диффузных и анапластических астроцитов на основе данных, собранных в ходе прямого масс-спектрометрического профилирования тканей, иссеченных в ходе планового нейрохирургического вмешательства. Липидные профили, полученные в ходе исследования образцов опухолевых тканей ($n = 43$) методом проточной микроэкстракции в картридже, анализировали с использованием линейного дискриминантного анализа со сжатием, что позволило выделить набор липидов, содержание которых изменяется при увеличении степени злокачественности опухоли. Разнообразие липидов снижается по мере повышения степени злокачественности, так, содержание 13 фосфолипидов, принадлежащих к 6 различным подклассам, оказывается сниженным в анапластических опухолях по сравнению с диффузными. С ростом злокачественности опухоли уменьшаются как средний размер жирнокислотных остатков полярных липидов, так и степень их ненасыщенности. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, полученными ранее в рамках исследования высокозлокачественных глиальных опухолей, и подтверждают биохимические представления о перепрограммировании метаболизма в ходе малигнизации нейроглии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, липиды, астроцитома, нейрохирургия, молекулярная диагностика

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-03-2022-107, проект № 0714-2020-0006). Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ХФ имени Н. Н. Семенова РАН.

Вклад авторов: С. И. Пеков — концепция, анализ данных, написание статьи; К. В. Бочаров — проведение эксперимента, предоставление ресурсов; Д. С. Бормотов — проведение эксперимента, анализ данных; В. А. Елиферов — проведение эксперимента, взаимодействие с хирургами; Е. В. Парочкина — проведение эксперимента; А. А. Сорокин — анализ данных, концепция; Е. Н. Николаев — предоставление ресурсов; И. А. Попов — поиск источников финансирования, руководство исследованием.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом НМИЦН имени Н. Н. Бурденко (протоколы № 40 от 12 апреля 2016 г. и № 131 от 17 июля 2018 г.), проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (2000 г.) и ее последующих пересмотров. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и использование биоматериалов в исследовательских целях.

✉ **Для корреспонденции:** Игорь Алексеевич Попов
Институтский пер., д. 9, стр. 7, Долгопрудный, 141701, Россия; popov.ia@mipt.ru

Статья получена: 11.01.2024 **Статья принята к печати:** 07.02.2024 **Опубликована онлайн:** 24.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.008

COMPARISON OF LIPID ALTERATIONS IN ASTROCYTOMAS WITH INCREASING GRADE

Pekov SI^{1,2,3}, Bocharov KV^{2,4}, Bormotov DS², Eliferov VA², Parochkina EV², Sorokin AA², Nikolaev EN¹, Popov IA^{2,3} ✉

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

³ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

⁴ Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Moscow, Russia

The use of ambient ionization mass spectrometry methods is one of the promising approaches to the improvement of glial tumor resection completeness by using an additional method to improve the tumor margin identification accuracy during the neurosurgical intervention itself. The amounts of data accumulated when testing such techniques can be also used in fundamental research to identify metabolic alterations associated with the tumor growth. The study was aimed to assess changes in the cell membrane lipid composition of diffuse and anaplastic astrocytomas based on the data acquired by ambient ionization mass spectrometry profiling of the tissues excised during the elective neurosurgical intervention. The lipid profiles obtained when assessing the tumor tissue samples ($n = 43$) by flow microextraction in a cartridge were subjected to shrinkage linear discriminant analysis enabling extraction of a number of lipids, the levels of which changed with increasing tumor grade. The lipid diversity decreased with increasing grade. Thus, the levels of 13 phospholipids belonging to six different subclasses turned out to be decreased in anaplastic tumors compared to diffuse ones. Both average size of the polar lipid fatty acid residues and their degree of unsaturation decrease with increasing tumor grade. The findings agree well with the data of the earlier study of high-grade glial tumors and confirm the biochemical view of metabolic reprogramming associated with malignant transformation of neuroglia.

Keywords: mass spectrometry, lipids, astrocytoma, neurosurgery, molecular diagnosis

Funding: the study was performed within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-03-2022-107, project № 0714-2020-0006). The study involved the use of equipment of the Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS.

Author contribution: Pekov SI — concept, data analysis, manuscript writing; Bocharov KV — experimental procedure, resource provision; Bormotov DS — experimental procedure, data analysis; Eliferov VA — experimental procedure, communication with surgeons; Parochkina EV — experimental procedure; Sorokin AA — data analysis, concept; Nikolaev EN — resource provision; Popov IA — search of funding sources, research management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Burdenko Research Institute of Neurosurgery (protocols № 40 dated 12 April 2016 and № 131 dated 17 July 2018) and conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki (2000) and its subsequent revisions. All patients submitted the informed consent to study participation and the use of biomaterial for scientific purposes.

✉ **Correspondence should be addressed:** Igor A. Popov
Institutskiy per., 9, str. 7, Dolgoprudny, 141701, Russia; popov.ia@mipt.ru

Received: 11.01.2024 **Accepted:** 07.02.2024 **Published online:** 24.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.008

Опухоли центральной нервной системы относят к числу наиболее требовательных к прецизионности хирургического вмешательства. Объем и полнота резекции являются одними из ключевых параметров, влияющих на исход комплексного лечения и общую долговременную выживаемость [1–3]. Таким образом, точность интраоперационного определения границ опухоли — важнейший параметр, контролируемый в ходе хирургического вмешательства, а хирург вынужден балансировать между требованием удаления максимального объема патологической ткани и сохранением прилежащих незатронутых функциональных областей головного мозга. Особенно сложны с этой точки зрения глиальные опухоли, характеризующиеся диффузным распространением опухолевых клеток. Интраоперационная компьютерная и магнитно-резонансная томографии и экспресс-гистологический анализ широко применяют в качестве методов, облегчающих принятие решений оперирующим хирургом, однако существенные затраты времени не позволяют применять их для непрерывного мониторинга в зоне резекции [4, 5]. Удобны и эффективны ультразвуковой контроль и флуоресцентное контрастирование, однако для ряда опухолей точность и специфичность этих методов уменьшаются до 50% [6, 7]. Методы молекулярного профилирования, основанные на масс-спектрометрическом детектировании, в настоящее время развиваются в быстрый и универсальный инструмент для сопровождения нейрохирургических операций [4, 8]. Вне зависимости от конкретной реализации метода пробоотбора и ионизации, масс-спектрометрические методы опираются на анализ метаболических особенностей опухолевых тканей, затрагивающие как изменение липидного состава пролиферирующих клеток, так и набор и концентрацию специфических метаболитов, таких как N-ацетиласпартат, 2-гидроксиглутарат и глутаминовая кислота [9–11].

Масс-спектрометрические профили, собираемые в ходе разработки подобных методов, позволяют создавать классификационные и регрессионные модели, различающие опухолевые и неопухолевые ткани с высокой чувствительностью и специфичностью [12, 13]. Следует отметить, что подобные модели в большинстве своем опираются не на единичный маркер, а на комбинацию многочисленных пиков в спектрах, отражающих процесс метаболического перепрограммирования, происходящий в процессе малигнизации ткани [14]. Раковым клеткам для пролиферации требуется большой объем биомассы, однако гиповаскуляризация опухоли приводит к недостатку питательных веществ. Активация анаэробного гликолиза даже в присутствии кислорода (эффект Варбурга) [15] приводит также к активации синтеза жирных кислот и ускорению липогенеза. Синтез насыщенных и недостаток поступающих с пищей ненасыщенных жирных кислот приводят к значительному изменению липидного состава клеток, в том числе перераспределению жирнокислотных остатков между триглицеридами и фосфолипидами [16]. Хотя биохимические основы, объясняющие отличия липидного состава клеток глиом от здоровых глиальных клеток, известны, детального исследования липидома опухолей до сих пор не проведено, поскольку подобные работы выполняют обычно на клеточных линиях, либо ксенографтах, что не в полной мере отражает естественную биологическую вариабельность опухолей, а также их физиологическое окружение [17]. Опухоли диффузной природы остаются сложным объектом для метаболомных

исследований ввиду трудностей в получении достаточного для исследования объема опухолевого материала, не содержащего включений клеток других типов.

Значительный объем данных, накапливаемый с применением методов молекулярного профилирования на основе масс-спектрометрии, позволяет исследовать метаболические изменения даже гетерогенных образцов, поскольку применение современных математических подходов дает возможность выделить характерные особенности молекулярных профилей, различающих ткани, отделив эти особенности от естественной биологической вариабельности и вклада иных клеток, присутствующих в образце [16, 18]. Цель данной работы — выявить различия липидного состава астроцитом 2-й и 3-й степени злокачественности с целью подтверждения предполагаемых метаболических изменений, сопровождающих злокачественное перерождение тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все образцы, включенные в исследование, были собраны выделенным для этой цели нейрохирургом, наблюдавшим за ходом операции с использованием систем нейронавигации и визуально. Основной критерий отбора — состав образца, который должен был включать в себя преимущественно опухолевую ткань. Участки, содержащие признаки некроза и большое количество сосудов, не отбирали для исследования. Образцы тканей промывали стерильным физраствором для удаления остатков крови и разделяли на две визуально схожие части. Одну часть замораживали и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения исследования. Вторую часть подвергали гистологическому исследованию профессиональным патоморфологом в рамках стандартных протоколов. На основании гистологического заключения образцы, содержащие менее 75% опухолевых клеток, а также образцы с признаками некроза исключали из исследования. Таким образом, было отобрано 28 образцов тканей анапластической астроцитомы (3-я степень злокачественности; получены от 23 пациентов) и 15 образцов диффузной астроцитомы (2-я степень злокачественности; получены от 12 пациентов).

Все собранные образцы анализировали в случайном порядке, при этом различные образцы, полученные от одного пациента, не анализировали в один день для минимизации возможной систематической погрешности. Каждый образец ткани размораживали непосредственно перед анализом и разделяли на 2–4 части, в зависимости от размера, которые немедленно подвергали масс-спектрометрическому профилированию. Всего был собран 81 масс-спектрометрический профиль образцов анапластической астроцитомы и 46 масс-спектрометрических профилей образцов диффузной астроцитомы.

Все образцы анализировали с использованием картриджной микроэкстракции (Inline Cartridge Extraction, ICE) [19]. Образец ткани объемом около 1 мм^3 помещали в одноразовый картридж, представляющий собой трубку из нержавеющей стали, на одном конце которой располагается кварцевый эмиттер электрораспыления, а с противоположной стороны трубка запечатывается при помощи входного капилляра из полиэфирэтилкетона. Кварцевый эмиттер защищен от попадания частиц ткани благодаря фильтру из стеклянного волокна. Образец в картридже промывали 100 мкл раствора, состоящего из изопропанола, метанола, ацетонитрила и воды (3 : 3 : 3 : 1 об.)

с добавлением 0,1% (об.) муравьиной кислоты, после чего картридж помещали в ионный источник масс-спектрометра. Экстракцию осуществляли непрерывной подачей упомянутого ранее растворителя со скоростью потока, равной 3 мкл/мин. Регистрацию масс-спектров проводили с использованием масс-спектрометра LTQ XL Orbitrap ETD (ThermoFisher Scientific; Сан-Хосе, США) с разрешением 30 000 (при m/z 400) в диапазоне m/z 500–1000, в двух полярностях последовательно.

В масс-спектрах удаляли пики с соотношением сигнал–шум менее 2, после чего удаляли пики, присутствующие менее чем в 25% индивидуальных сканов в каждой группе. В дальнейшем анализировали только пики, интенсивность которых в спектрах была выше медианной. Выделение пиков, характеризующих каждую из групп образцов, проводили с помощью дискриминантного анализа со сжатием (shrinkage discriminant analysis) [20]. Значимость каждого из выделенных пиков оценивали при помощи критерия *l*fd_r (local false discovery rate), показывающего вероятность того, что индивидуальный пик не будет оказывать влияния на классификацию образцов. Пороговое значение *l*fd_r было выбрано 33%.

По два образца ткани наибольшего объема из каждой группы были также использованы для идентификации липидов. Для этого примерно 10 мг ткани гомогенизировали в 400 мкл указанного ранее раствора на льду. Гомогенат обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 5 мин и центрифугировали при 21 000 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант переносили в хроматографическую вialу и выпаривали под вакуумом. Липиды перерастворяли в 20 мкл раствора, состоящего из *n*-бутанола, изопропанола и воды (8 : 21 : 69 об.) с добавлением 5 мМ ортофосфорной кислоты. Анализ липидов проводили с применением обращенно-фазовой нанопоточной ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения с использованием указанного выше масс-спектрометра. Идентификацию липидов проводили с использованием ПО LipiDex.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ограниченный динамический диапазон масс-анализаторов не позволяет делать однозначных количественных выводов о содержании молекул в исходной биологической пробе. Однако изменение относительных интенсивностей пиков между собой пропорционально изменению содержания соответствующих молекул на фоне других соединений выбранного класса. Используемая в работе смесь растворителей эффективно растворяет липиды, особенно полярные липиды клеточных мембран, которые легко ионизируются и детектируются в выбранном диапазоне масс. Таким образом, молекулярные профили, собираемые в рамках данного исследования, соответствуют преимущественно липидной компоненте клетки. Применение SDA [20], подвида линейного дискриминантного анализа, учитывающего внутренние корреляции, вызываемые наличием естественного распределения стабильных изотопов в биологических молекулах (для липидов это преимущественно ¹³C), позволяет выделить ионы, интенсивность которых различается между образцами анализируемых групп. Рассчитываемый при этом CAT-score (correlation adjusted *t*-score) является аналогом *t*-статистики Стьюдента, учитывающим как внутренние корреляции и высокую размерность исходных данных, так и отклонение распределения интенсивности пиков от нормального. Величина CAT-score демонстрирует отклонение интенсивности индивидуального пика от среднего в сторону соответствующей группы. В результате, было выделено 13 ионов липидов, уровень которых повышен, в образцах диффузной астроцитомы по сравнению с образцами анапластической, и три иона липида, повышенных в спектрах, соответствующих образцам анапластической астроцитомы (таблица). Химическую идентификацию ионов проводили при помощи тандемной хромато-масс-спектрометрии на основе экстракции липидов из образцов

Таблица. Значимость ионов полярных липидов при отнесении спектров к группам диффузной или анапластической астроцитомы. Объединены результаты анализов как положительно-заряженных, так и отрицательно-заряженных ионов

CAT-score	m/z	Ион
Ионы, характерные для образцов диффузной астроцитомы		
71,4	742,55	[PE(36:2)-H] ⁻
61,9	782,58	[PC(34:1)+Na] ⁺
53	786,57	[PS(36:2)-H] ⁻
52,3	780,57	[PC(34:2)+Na] ⁺
47,3	700,53	[PA(36:2)-H] ⁻
46,3	857,59	[PI(36:4)-H] ⁻
45,9	754,55	[PC(32:1)+Na] ⁺
45,3	794,55	[PE(40:4)-H] ⁻
44	797,61	[PG(38:4)-H] ⁻
43	820,57	[PC(34:0)-H] ⁻
40,8	792,53	[PC(32:0)-H] ⁻
39,6	920,71	[PC(44:2)+Na] ⁺
39,4	808,56	[PC(36:2)+Na] ⁺
Ионы, характерные для образцов анапластической астроцитомы		
48	772,53	[PE(38:1)-H] ⁻
44,1	762,58	[PC(30:1)-H] ⁻
40,2	646,62	[PA(32:1)-H] ⁻

тканей, отличающихся наибольшим размером, что было бы невозможно для большинства образцов, ввиду малого объема доступного биоматериала. Таким образом, за счет применения масс-спектрометрического профилирования тканей без прободготовки была решена задача сохранения естественной биологической вариабельности анализируемых опухолей и учета межпациентной вариабельности.

Все выделенные пики не относятся к наиболее интенсивным в масс-спектрах и принадлежат ко второму и третьему квартилям распределения по интенсивностям. Это связано с тем, что наиболее и наименее интенсивные пики сильно связаны с естественной вариабельностью и могут значительно изменяться между пациентами, что делает их внутригрупповую вариабельность сравнимой с межгрупповой на данном размере выборки. Однако полученные результаты демонстрируют снижение разнообразия в липидном составе по мере роста злокачественности, что соответствует общей картине, представленной ранее при сравнении глиальных опухолей 4-й степени злокачественности с образцами неопухолевого контроля [16].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наблюдаемые различия в липидном составе между астроцитомами 2-й и 3-й степени злокачественности демонстрируют снижение содержания фосфолипидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, что свидетельствует о росте доли *de novo* синтезированных жирных кислот в мембранах клеток глиом при повышении степени их злокачественности. Наблюдается также снижение содержания фосфолипидов с полностью насыщенными жирнокислотными остатками, поскольку, согласно предыдущим исследованиям, наиболее злокачественные клетки глиом накапливают насыщенные жирные кислоты в липидных каплях, чтобы использовать их для поддержания метаболической активности на более поздних стадиях развития заболевания, при которых доступность питательных веществ будет снижена в еще большей степени [15, 21].

Следует отметить, что относительное содержание фосфатидилихолинов PC(32:1), PC(34:1) и PC(34:2) не однозначно соотносится с общей картиной роста астроцитом. Так, было показано, что эти липиды в значительной мере характеризуют именно высокозлокачественную, а не неопухолевую, мозговую ткань [16], в то время как при сравнении диффузных и анапластических астроцитом эти липиды оказались

характерны для менее злокачественной формы. Это наблюдение свидетельствует о неравномерности уменьшения содержания липидов различных классов по мере роста злокачественности, что приводит к увеличению наблюдаемой доли перечисленных выше лецитинов в диффузных астроцитомах, и одновременно демонстрирует ограничение, накладываемое прямым масс-спектрометрическим профилированием на возможность анализировать липидный состав без дополнительного применения более информативных методов хромато-масс-спектрометрии. Анализ суммарного жирнокислотного состава отдельных липидов, который возможен с использованием прямой масс-спектрометрии, не позволяет различать изомерные липиды. Так, например, фосфолипид PC(34:1) может состоять из остатков пальмитолеиновой и стеариновой кислот, равно как и из остатков пальмитиновой и олеиновой кислот. Среди жирных кислот именно пальмитиновая наиболее доступна для включения в состав липидов по мере роста злокачественности, поскольку является основным продуктом, выделяющимся в ходе функционирования НАДФ·Н-зависимой синтазы жирных кислот [14]. Следует отметить, что активируемый благодаря эффекту Варбурга пентозофосфатный путь приводит к повышенной генерации НАДФ·Н опухолевой клеткой [22]. Таким образом, при повышении злокачественности можно наблюдать как расходование пула фосфолипидов, содержащих 32–34 атома углерода в жирнокислотных цепях [21, 23], так и их активное замещение изомерными липидами, содержащими синтезированные *de novo* жирнокислотные цепи, при переходе к астроцитомам 4-й степени злокачественности.

ВЫВОДЫ

Применение методов молекулярного профилирования позволяет исследовать изменения в липидном составе опухолевых тканей различной степени злокачественности с учетом их естественной биологической вариабельности. По мере роста злокачественности астроцитом прослеживается тенденция к уменьшению разнообразия полярных липидов в составе клеточных мембран. Уменьшаются также длина и степень ненасыщенности жирнокислотных остатков, составляющих эти липиды. Данный эффект связан с активацией синтеза жирных кислот вследствие метаболического перепрограммирования глиальных клеток в процессе их малигнизации, а в случае с высокозлокачественными глиальными опухолями и с активацией пути бета-окисления жирных кислот для поддержания жизнедеятельности клетки.

Литература

1. Kraitsoulas D, Damante M, Gruber M, et al. Supratotal surgical resection for low-grade glioma: a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2023; 15 (9): 2493.
2. Karschnia P, Vogelbaum MA, van den Bent M, et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma. *Eur J Cancer*. 2021; 149: 23–33.
3. Chanbour H, Chotai S. Review of intraoperative adjuncts for maximal safe resection of gliomas and its impact on outcomes. *Cancers (Basel)*. 2022; 14: 22.
4. Bogusiewicz J, Wojko B. Insight into new opportunities in intra-surgical diagnostics of brain tumors. *TrAC — Trends Anal Chem. Elsevier B.V.* 2023; 162: 117043.
5. Cordova JS, Gurbani SS, Olson JJ, et al. A systematic pipeline for the objective comparison of whole-brain spectroscopic MRI with histology in biopsy specimens from grade 3 glioma. *Tomography*. 2016; 2 (2): 106–16.
6. Schupper AJ, Rao M, Mohammadi N, et al. Fluorescence-guided surgery: a review on timing and use in brain tumor surgery. *Front Neurol*. 2021; 12.
7. Behbahania M, Martirosyan NL, Georges J, et al. Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: a review. *Clin Neurol Neurosurg. Elsevier B.V.* 2013; 115 (5): 517–28.
8. Pekov SI, Bormotov DS, Nikitin PV, et al. Rapid estimation of tumor cell percentage in brain tissue biopsy samples using inline

- cartridge extraction mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021; 413 (11): 2913–22.
9. Brown HM, Alfaro CM, Pirro V, et al. Intraoperative mass spectrometry platform for IDH mutation status prediction, glioma diagnosis, and estimation of tumor cell infiltration. *J Appl Lab Med*. 2021; 6 (4): 902–16.
 10. Eberlin LS, Dill AL, Golby AJ, et al. Discrimination of human astrocytoma subtypes by lipid analysis using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010; 49 (34): 5953–6.
 11. Bormotov D, Shamraeva M, Kuzin A, et al. Ambient ms profiling of meningiomas: intraoperative oncometabolite-based monitoring. *Bull Russ State Med Univ*. 2022; 2022 (6): 74–81.
 12. King ME, Lin M, Spradlin M, et al. Advances and emerging medical applications of direct mass spectrometry technologies for tissue analysis. *Annu Rev Anal Chem*. 2023; 16: 1–25.
 13. Eberlin LS, Margulis K, Planell-Mendez I, et al. Pancreatic cancer surgical resection margins: molecular assessment by mass spectrometry imaging. *PLOS Med*. 2016; 13 (8): e1002108.
 14. Sorokin A, Shurkhay V, Pekov S, et al. Untangling the metabolic reprogramming in brain cancer: discovering key molecular players using mass spectrometry. *Curr Top Med Chem*. 2019; 19 (17): 1521–34.
 15. Duraj T, García-Romero N, Carrión-Navarro J, et al. Beyond the Warburge effect: oxidative and glycolytic phenotypes coexist within the metabolic heterogeneity of glioblastoma. *Cells*. 2021; 10 (2): 202.
 16. Pekov SI, Sorokin AA, Kuzin AA, et al. Analysis of phosphatidylcholines alterations in human glioblastomas ex vivo. *Biochem Suppl Ser B Biomed Chem* 2021; 15 (3): 241–7.
 17. McNeill RS, Vitucci M, Wu J, et al. Contemporary murine models in preclinical astrocytoma drug development. *Neuro Oncol*. 2015; 17 (1): 12–28.
 18. Mason SE, Manoli E, Alexander JL, et al. Lipidomic profiling of colorectal lesions for real-time tissue recognition and risk-stratification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Ann Surg*. 2023; 277 (3): e569–e577.
 19. Bormotov DS, Eliferov VA, Peregudova OV, et al. Incorporation of a disposable ESI emitter into inline cartridge extraction mass spectrometry improves throughput and spectra stability. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2023; 34 (1): 119–22.
 20. Ahdesmäki M, Strimmer K. Feature selection in omics prediction problems using cat scores and false nondiscovery rate control. *Ann Appl Stat*. 2010; 4 (1): 503–19.
 21. Wu X, Geng F, Cheng X, et al. Lipid droplets maintain energy homeostasis and glioblastoma growth via autophagic release of stored fatty acids. *Science*. Elsevier Inc., 2020; 23 (10): 101569.
 22. Jaráz-Rodríguez M, del Prado L, Balsa E. Metabolic remodeling in astrocytes: paving the path to brain tumor development. *Neurobiol Dis*. 2023; 188: 106327.
 23. Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, et al. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int*. 2014; 2014.

References

1. Kreatsoulas D, Damante M, Gruber M, et al. Supratotal surgical resection for low-grade glioma: a systematic review. *Cancers (Basel)*. 2023; 15 (9): 2493.
2. Karschnia P, Vogelbaum MA, van den Bent M, et al. Evidence-based recommendations on categories for extent of resection in diffuse glioma. *Eur J Cancer*. 2021; 149: 23–33.
3. Chanbour H, Chotai S. Review of intraoperative adjuncts for maximal safe resection of gliomas and its impact on outcomes. *Cancers (Basel)*. 2022; 14: 22.
4. Bogusiewicz J, Bojko B. Insight into new opportunities in intra-surgical diagnostics of brain tumors. *TrAC — Trends Anal Chem*. Elsevier B.V. 2023; 162: 117043.
5. Cordova JS, Gurbani SS, Olson JJ, et al. A systematic pipeline for the objective comparison of whole-brain spectroscopic MRI with histology in biopsy specimens from grade 3 glioma. *Tomography*. 2016; 2 (2): 106–16.
6. Schupper AJ, Rao M, Mohammadi N, et al. Fluorescence-guided surgery: a review on timing and use in brain tumor surgery. *Front Neurol*. 2021; 12.
7. Behbahaninia M, Martirosyan NL, Georges J, et al. Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: a review. *Clin Neurol Neurosurg*. Elsevier B.V. 2013; 115 (5): 517–28.
8. Pekov SI, Bormotov DS, Nikitin PV, et al. Rapid estimation of tumor cell percentage in brain tissue biopsy samples using inline cartridge extraction mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021; 413 (11): 2913–22.
9. Brown HM, Alfaro CM, Pirro V, et al. Intraoperative mass spectrometry platform for IDH mutation status prediction, glioma diagnosis, and estimation of tumor cell infiltration. *J Appl Lab Med*. 2021; 6 (4): 902–16.
10. Eberlin LS, Dill AL, Golby AJ, et al. Discrimination of human astrocytoma subtypes by lipid analysis using desorption electrospray ionization imaging mass spectrometry. *Angew Chemie - Int Ed*. 2010; 49 (34): 5953–6.
11. Bormotov D, Shamraeva M, Kuzin A, et al. Ambient ms profiling of meningiomas: intraoperative oncometabolite-based monitoring. *Bull Russ State Med Univ*. 2022; 2022 (6): 74–81.
12. King ME, Lin M, Spradlin M, et al. Advances and emerging medical applications of direct mass spectrometry technologies for tissue analysis. *Annu Rev Anal Chem*. 2023; 16: 1–25.
13. Eberlin LS, Margulis K, Planell-Mendez I, et al. Pancreatic cancer surgical resection margins: molecular assessment by mass spectrometry imaging. *PLOS Med*. 2016; 13 (8): e1002108.
14. Sorokin A, Shurkhay V, Pekov S, et al. Untangling the metabolic reprogramming in brain cancer: discovering key molecular players using mass spectrometry. *Curr Top Med Chem*. 2019; 19 (17): 1521–34.
15. Duraj T, García-Romero N, Carrión-Navarro J, et al. Beyond the Warburge effect: oxidative and glycolytic phenotypes coexist within the metabolic heterogeneity of glioblastoma. *Cells*. 2021; 10 (2): 202.
16. Pekov SI, Sorokin AA, Kuzin AA, et al. Analysis of phosphatidylcholines alterations in human glioblastomas ex vivo. *Biochem Suppl Ser B Biomed Chem* 2021; 15 (3): 241–7.
17. McNeill RS, Vitucci M, Wu J, et al. Contemporary murine models in preclinical astrocytoma drug development. *Neuro Oncol*. 2015; 17 (1): 12–28.
18. Mason SE, Manoli E, Alexander JL, et al. Lipidomic profiling of colorectal lesions for real-time tissue recognition and risk-stratification using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Ann Surg*. 2023; 277 (3): e569–e577.
19. Bormotov DS, Eliferov VA, Peregudova OV, et al. Incorporation of a disposable ESI emitter into inline cartridge extraction mass spectrometry improves throughput and spectra stability. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2023; 34 (1): 119–22.
20. Ahdesmäki M, Strimmer K. Feature selection in omics prediction problems using cat scores and false nondiscovery rate control. *Ann Appl Stat*. 2010; 4 (1): 503–19.
21. Wu X, Geng F, Cheng X, et al. Lipid droplets maintain energy homeostasis and glioblastoma growth via autophagic release of stored fatty acids. *Science*. Elsevier Inc., 2020; 23 (10): 101569.
22. Jaráz-Rodríguez M, del Prado L, Balsa E. Metabolic remodeling in astrocytes: paving the path to brain tumor development. *Neurobiol Dis*. 2023; 188: 106327.
23. Panov A, Orynbayeva Z, Vavilin V, et al. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int*. 2014; 2014.

ВЛИЯНИЕ ПРОБЕНЕЦИДА НА АКТИВАЦИЮ АСТРОЦИТОВ *IN VITRO*И. И. Бабкина¹, В. В. Мазеева², М. П. Морозова¹, Л. Р. Горбачева^{1,2}✉¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Нейровоспаление развивается в мозговой ткани как при острых повреждениях мозга, так и при нейродегенеративных заболеваниях. От баланса провоспалительных и противовоспалительных факторов будет зависеть исход нейровоспаления и прогноз функционального состояния мозга. Поэтому целью многих исследований является поиск возможных терапевтических мишеней, позволяющих сдвигать ход воспалительной реакции в пользу реализации противовоспалительных механизмов. Показано, что каналы, образованные белками паннексинами экспрессируются во всех клетках мозга, в том числе и в астроцитах. Однако их роль в процессах нейровоспаления пока не ясна. Каналы, сформированные паннексином 1 (Panx1), могут быть вовлечены в провоспалительную активацию астроцитов, индуцируемую тромбином и/или липополисахаридом (ЛПС). Целью исследования было оценить тромбин- и ЛПС-вызванную активацию первичных кортикальных астроцитов мыши в условиях блокады Panx1 пробенецидом. Установлено, что и в случае аппликации тромбина (50 и 100 нМ), и в случае инкубации клеток с ЛПС, происходит изменение функционального профиля астроцитов, изменяется их пролиферация и секреторная активность. Наблюдаемое при этом увеличение секреции NO, β-гексозаминазы (БГА) и IL6 прекращалось на фоне обработки клеток пробенецидом. Полученные результаты свидетельствуют о возможности рассматривать пробенецид в качестве потенциального агента, влияющего на воспалительный процесс в мозговой ткани путем стабилизации астроцитов через инактивацию Panx1 и снижение астроглиоза.

Ключевые слова: нейровоспаление, пробенецид, паннексин 1, Panx1, астроциты, тромбин, липополисахарид, астроглиоз**Финансирование:** работа поддержана Российским научным фондом, грант 22-25-00848.**Вклад авторов:** И. И. Бабкина, М. П. Морозова — получение и ведение первичной культуры астроцитов; сбор, интерпретация и статистическая обработка данных, написание рукописи; В. В. Мазеева — получение и ведение первичной культуры астроцитов, интерпретация и статистическая обработка данных; Л. Р. Горбачева — концепция и дизайн эксперимента, интерпретация данных, руководство проектом, написание рукописи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 23/2021 от 13 декабря 2021 г.).✉ **Для корреспонденции:** Любовь Руфальевна Горбачева
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; gorb167@mail.ru**Статья получена:** 13.12.2023 **Статья принята к печати:** 24.01.2024 **Опубликована онлайн:** 26.02.2024**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.005EFFECT OF PROBENECID ON ASTROCYTE ACTIVATION *IN VITRO*Babkina II¹, Mазеева VV², Morozova MP¹, Gorbacheva LR^{1,2}✉¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Both acute brain injuries and neurodegenerative diseases are accompanied by neuroinflammation. The outcome of neuroinflammation and the prognosis of brain functional status depend on the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory factors. Many studies are aimed at finding possible therapeutic targets allowing to shift inflammatory response processes towards anti-inflammatory mechanisms. It has been shown that channels formed by pannexin proteins are expressed in all brain cells including astrocytes. However, their role in the processes of neuroinflammation is still unclear. Channels formed by pannexin 1 (Panx1) may be involved in proinflammatory activation of astrocytes induced by thrombin and/or lipopolysaccharide (LPS). The aim of this study was to assess thrombin- and LPS-induced activation of primary mouse cortical astrocytes under Panx1 blockade by probenecid. Functional profile of astrocytes, their proliferation and secretory activity changed both in case of thrombin application (50 nM and 100 nM) and in case of incubating cells with LPS. The observed increasing of nitric oxide (NO), β-hexosaminidase HEX and IL6 secretion stopped after the cells were treated with probenecid. Based on the obtained results, probenecid can be considered as a potential agent influencing the inflammatory process in brain tissue by stabilizing astrocytes through inactivation of Panx1 and reduction of astrogliosis.

Keywords: neuroinflammation, probenecid, pannexin 1, astrocytes, thrombin, lipopolysaccharide, astrogliosis**Funding:** The study was supported by the Russian Science Foundation, Project № 22-25-00848.**Author contribution:** Babkina II, Morozova MP — obtaining and maintaining primary culture of astrocytes; collection, interpretation and statistical analysis of data, manuscript writing; Mазеева VV — obtaining and maintaining primary culture of astrocytes, interpretation and statistical analysis of data; Gorbacheva LR — conception and design of the experiment, interpretation of data, project management, manuscript writing.**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethical Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (Protocol № 23/2021 dated December 13, 2021).✉ **Correspondence should be addressed:** Lyubov R. Gorbacheva,
Ostrovitianova, 1, Moscow, 117997, Russia; gorb167@mail.ru**Received:** 13.12.2023 **Accepted:** 24.01.2024 **Published online:** 26.02.2024**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.005

Воспалительный ответ направлен на удаление повреждающего агента и восстановление структурно-функциональной целостности ткани и может сопровождаться как патогенетическими, так и адаптивными изменениями. Запуск острой воспалительной реакции в нервной ткани способен активировать процессы нейрогенеза, ангиогенеза и функциональной пластичности нейронов. Однако хроническое течение воспаления потенцирует

дальнейшую альтерацию клеток и усугубляет ход нейродегенеративных заболеваний, повышая риск развития осложнений и инвалидизации пациентов.

Астроциты — одни из самых многочисленных клеток ЦНС, вовлеченных в реализацию нейровоспаления. Степень их активности в значительной мере определяет исход нейровоспаления. Активированные резидентные и иммунокомпетентные клетки ЦНС, включая микроглию

и астроциты, являются источниками провоспалительных факторов. В результате происходит увеличение проницаемости ГЭБ, инфильтрация иммунных клеток в ткани мозга, дополнительная альтерация, активация системы гемостаза и образование тромбина.

Показано, что развитие нейродегенеративных процессов сопряжено с тромбин-зависимым усилением активации микроглии и опосредовано стимуляцией iNOS, секрецией активных форм кислорода (АФК) и провоспалительных факторов COX2, TNF α , IL1 β , IL6 [1]. Кроме того, тромбин потенцирует пролиферацию астроцитов через активацию PAR1/MAPK-каскада.

Запуск нейровоспаления может быть также вызван экзогенными факторами, например, липополисахаридом (ЛПС), компонентом клеточной стенки бактерий. Основной мишенью ЛПС является рецептор TLR4, экспрессируемый астроцитами, микроглией и эндотелием, а его активация запускает образование провоспалительных медиаторов.

Важную роль в развитии воспалительного ответа с участием астроцитов играют каналы, образованные белками паннексинами. Последние не только обеспечивают транспорт веществ, но и формируют ансамбли с другими ионо- и метаболитными рецепторами, регулируя активность этих рецепторов [2]. Особую роль играет паннексин 1 (Panx1), который широко представлен в ЦНС и экспрессируется нейронами, астроцитами, микроглией, церебральным эндотелием и гладкомышечными клетками [3]. Panx1 регулирует высвобождение из клеток АТФ и других нуклеотидов, сборку инфламмосом и секрецию цитокинов, что определяет его вклад в развитие ряда нейродегенеративных процессов. В связи с этим, Panx1 является потенциальной мишенью для фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний и острых повреждений мозга [4, 5].

Потенциальным нейропротектором может быть пробенецид, обладающий широким спектром действия, включая ингибирование Panx1. Показано, что пробенецид способен специфично активировать TRPV2 в сенсорных нейронах и блокировать высвобождение АТФ из клеток как астроцитов, так и микроглии [5, 6]. Поэтому его рассматривают в качестве перспективного препарата для лечения нейродегенеративных и психиатрических заболеваний.

Таким образом, цель настоящего исследования оценить влияние пробенецида, блокатора Panx1, на тромбин- и ЛПС-индуцированную провоспалительную активацию астроцитов мыши *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вещества и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: 10 \times HBSS без Ca²⁺ и Mg²⁺ (Gibco; США), 1 M HEPES (Gibco; США), 10 \times PBS (Gibco; США), BSA (Sigma; США), среда для культивирования клеток DMEM/F12 (Gibco; США), инактивированная телячья сыворотка HI FBS (Gibco; США), пенициллин-стрептомицин (Invitrogen; США), трипсин-ЭДТА (Gibco; США), раствор Версена («Панэко»; Россия); пробенецид (BioQuest; США); тромбин (Sigma; США), липополисахарид *Escherichia coli* O111:B4 (L3024; Sigma, США), WST-1 (Sigma; США), реактив Грисса (Sigma; США), реактив для измерения клеточной пролиферации WST-1 ДНКазы (Sigma; США), Mouse IL6 ELISA kit (abcam ab 222503), Triton \times 100, лизирующий буфер, раствор RIPA и ингибиторы протеаз и фосфатаз, реагент Бредфорда (Bio-Rad; США).

Получение и ведение первичной культуры астроцитов

Первичные кортикальные астроциты выделяли из полушарий мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 0–3 дня. Для получения клеточных культур использовали протокол, описанный ранее [7]. Полушария головного мозга извлекали и помещали в буфер (1 \times HBSS, 100 мМ пирувата натрия и 1M HEPES), промывали и измельчали. Далее гомогенат мозга инкубировали с папаином 0,5 мг/мл (1 \times PBS, L-Cystein-HCl, BSA, глюкоза, 8 мин, 37 °C). Затем гомогенат ресуспендировали в буфере, содержащем ДНКазу (0,01 мг/мл), после чего центрифугировали при 1500 об. в течение 5 мин при +4 °C. Полученный осадок ресуспендировали в буфере (1 \times HBSS с Ca²⁺ и Mg²⁺, 100 мМ пируват натрия, 1M HEPES) и повторно центрифугировали. Осадок ресуспендировали в 1 мл культуральной среды (DMEM/F12, 10% FBS, антибиотик-антимикотик, GlutaMAX). Клетки помещали в культуральные флаконы 25 см² и культивировали 10–12 дней при 37 °C и 5% CO₂. На 2-е и 7-е сутки проводили полную смену среды, удаляя микроглию, помещая флакон с клетками на шейкер на 6–8 ч с последующей заменой среды на свежую. За 4 суток до эксперимента клетки снимали с флакона 0,05%-м раствором трипсина в фосфатно-солевом буфере и помещали в 48-луночные планшеты. Перед экспериментальным воздействием среду в культурах заменяли на бессывороточную на 3 ч с последующим добавлением тромбина в конечной концентрации 50 нМ или 100 нМ или ЛПС в концентрации 100 нг/мл или 1 мкг/мл. Пробенецид 0,1 мМ добавляли за 30 мин до воздействия тромбина или ЛПС. Через 6, 24 и 48 ч проводили измерения.

Измерение выживаемости астроцитов (WST-тест)

Выживаемость оценивали через 24 ч после активации астроцитов с помощью теста WST-1 в соответствие с протоколом производителя. Оптическую плотность образцов измеряли при $\lambda = 450$ нм на планшетном фотометре iMark (BioRad; США). Полученные данные интерпретировали как пролиферацию клеток, предполагая, что вклад клеточной гиперплазии в данных условиях не значителен, и ориентируясь на производителя, представляющего данный тест как WST-1-пролиферативный реагент.

Измерение накопления нитритов в среде культивирования астроцитов

Секрецию оксида азота (NO) оценивали по накоплению в среде культивирования нитритов через 24 ч после инкубации с индукторами воспаления с помощью реактива Грисса. Реактив Грисса при взаимодействии с нитритами образует окрашенные азотсоединения, интенсивность поглощения которых оценивали при $\lambda = 530$ нм на планшетном фотометре iMark (BioRad; США). Результаты представляли в относительных значениях, как секрецию NO одной клеткой, используя отношение уровня нитритов в культуральной среде к количеству клеток в соответствующей лунке планшета, оцененному при помощи WST-теста.

Измерение активности β -гексозаминидазы

Активность β -гексозаминидазы (БГА) оценивали через 24 и 48 ч после активации астроцитов по модифицированному

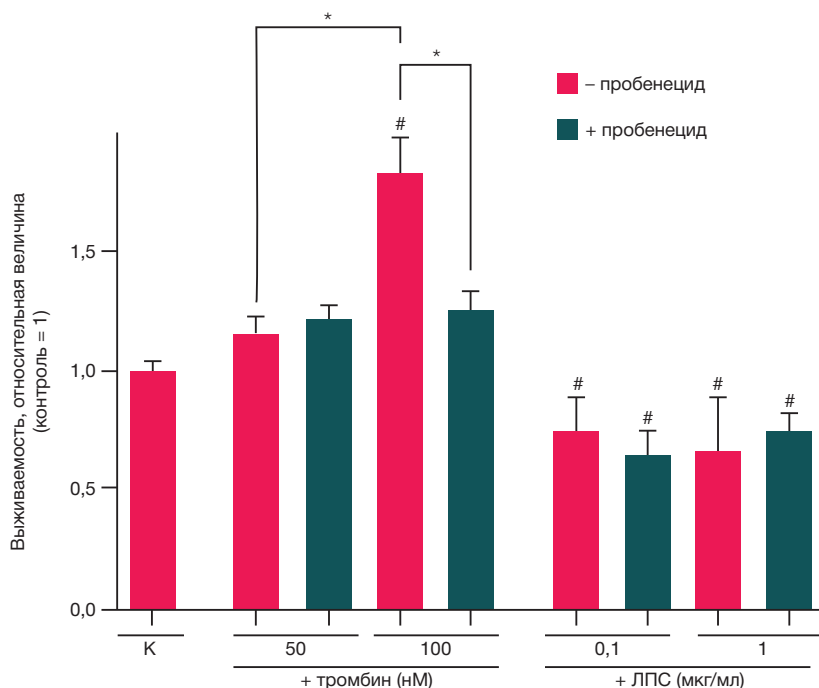


Рис. 1. Влияние блокады Pаnх1 на выживаемость активированных тромбином или ЛПС астроцитов. * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ (по сравнению с контролем); К — контроль; $n \geq 8$

методу, предложенному Schwartz LB и соавторами [8] в супернатанте и внутриклеточно для последующего расчета секреции фермента по формуле:

$$X / (X + Y) \times 100\%$$

где X — оптическая плотность образца, отражающая активность фермента в среде культивирования за вычетом оптической плотности фона; Y — оптическая плотность образца, отражающего активность внутриклеточного пула фермента за вычетом оптической плотности фона.

Далее секрецию БГА представляли в относительных единицах по отношению к контролю, принятому за 1.

Измерение уровня секреции IL6 астроцитами

Секрецию IL6 через 6 ч после воздействия исследуемых веществ на первичную культуру астроцитов оценивали с помощью коммерческого набора ELISA (Mouse IL6 ELISA kit (abcam ab 222503) в соответствии с протоколом производителя. Предел чувствительности IL6 составлял 30 пг IL6/мл. После воздействия исследуемых веществ отбирали культуральную среду, в которой определяли с помощью набора содержание IL6. Клетки в лунках планшета промывали натрий-фосфатным буфером и лизировали с помощью RIPA-буфера с добавлением ингибиторов протеаз. Лизаты центрифугировали при 14 000 g 15 мин при 4 °C, после чего в супернатанте измеряли содержание общего белка с помощью реактива Бредфорда. Секрецию IL6 представляли в пг/мг общего белка.

Статистическая обработка

Анализ данных производили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.; США). Нормальность распределения выборок проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим апостериорным анализом при

помощи критерия Тьюки. Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка (SEM), различия считали статистически значимыми (*) при $p < 0,05$. Количество экспериментов (n , число посадок астроцитов) указаны в каждом случае отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние пробенецида на выживаемость активированных тромбином и ЛПС астроцитов

Тромбин является одним из участников воспалительного ответа, поскольку система гемостаза одной из первых реагирует на повреждение тканей. В первой серии экспериментов нейровоспаление моделировали добавлением тромбина в среду культивирования астроцитов мыши. Продемонстрировано, что тромбин в концентрации 100 нМ значимо ($p < 0,05$) повышает число живых астроцитов, а обработка клеток пробенецидом снижает данный показатель до контрольных значений, что может свидетельствовать об участии Pаnх1 каналов в тромбин-индуцированной пролиферации астроцитов (рис. 1). В отличие от тромбина, ЛПС в данных условиях во всех используемых концентрациях вызывал снижение выживаемости, что может свидетельствовать о его токсическом действии на астроциты (рис. 1). Пробенецид не изменял эффект ЛПС (рис. 1).

Влияние пробенецида на секрецию NO активированными астроцитами

Увеличение продукции NO в очаге поражения является признаком развития нейровоспаления. Исследование влияния тромбина и ЛПС на секрецию NO астроцитами показало, что через 24 ч после аппликации тромбина 100 нМ, но не 50 нМ происходит значительное накопление нитритов в культуральной среде астроцитов, при этом пробенецид отменяет тромбин-вызванную секрецию NO, что указывает на необходимость участия в данном

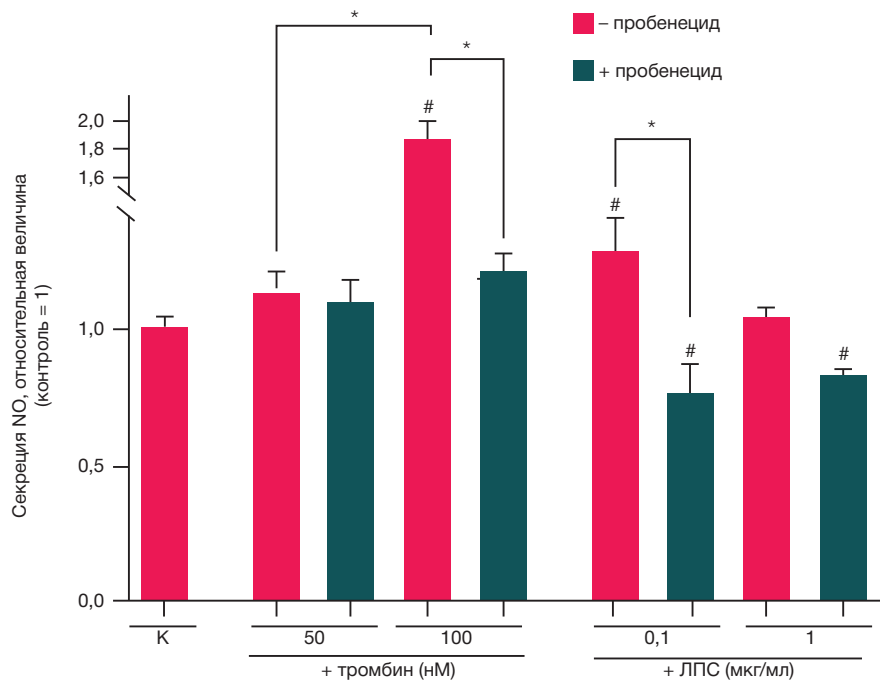


Рис. 2. Влияние блокады каналов Panx1 пробенецидом на секрецию NO астроцитами при их инкубации с тромбином/ЛПС. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 6$

процессе Panx1 (рис. 2). В случае с 24-часовой инкубацией клеток с ЛПС наиболее выраженный рост секреции был обнаружен при концентрации 0,1 мкг/кг ЛПС, который удавалось отменить блокадой Panx1 . При повышении концентрации ЛПС до 1 мкг/кг секреция NO не отличалась от контрольных значений и не зависела от Panx1 (рис. 2).

Влияние пробенецида на секрецию β -гексозаминидазы активированными астроцитами

Другим маркером провоспалительной активации астроцитов может быть высвобождение из клеток лизосомного фермента β -гексозаминидазы (БГА).

Оценку влияния пробенецида на секрецию БГА астроцитами осуществляли через 24 и 48 ч после их активации тромбином в концентрации 50 и 100 нМ и ЛПС 0,1 и 1 мкг/мл. Через 24 ч наблюдали провоспалительное

действие тромбина в концентрации 100 нМ и привлечение к реализации данного эффекта Panx1 , поскольку его блокада пробенецидом значительно снижает секрецию БГА (рис. 3). Апликация ЛПС в концентрации 0,1 мкг/мл вызывала через 24 ч активацию клеток, в отличие от влияния 1 мкг/мл ЛПС (рис. 3). В обоих случаях блокада Panx1 -каналов пробенецидом не изменяла эффекта эндотоксина (рис. 3).

Увеличение времени экспозиции тромбина с 24 до 48 ч привело к более выраженному повышению секреции БГА астроцитами и было опосредовано Panx1 , поскольку на фоне пробенецида данный показатель снижается до контрольных значений (рис. 4). Секреция БГА на фоне ЛПС, аналогично тромбину, более выражена через 48 ч после воздействия. При этом противовоспалительный эффект пробенецида проявляется только на фоне ЛПС в концентрации 1 мкг/мл — секреция БГА клетками снижается до уровня контроля (рис. 4).

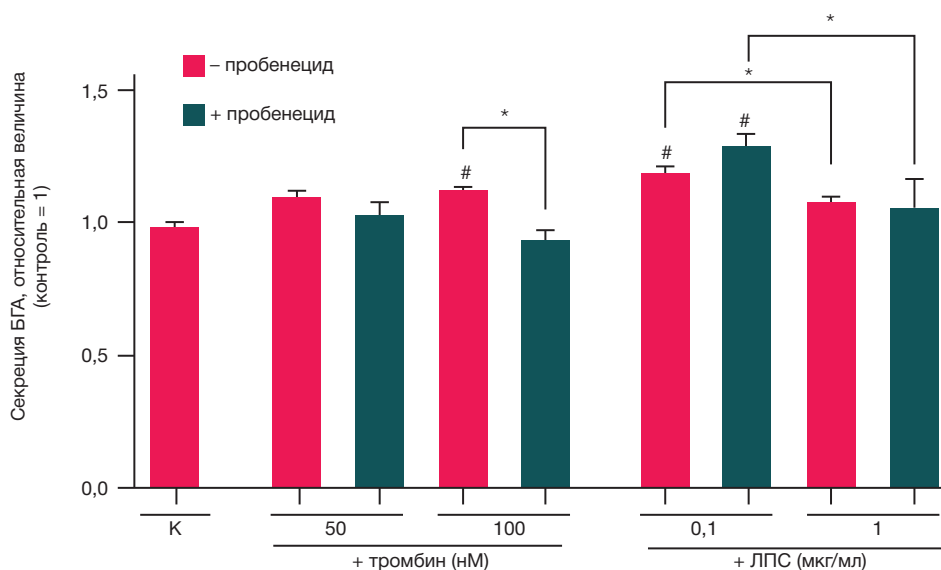


Рис. 3. Влияние блокады Panx1 на тромбин/ЛПС-вызванную секрецию БГА астроцитами мыши. Секрецию БГА оценивали через 24 ч после воздействия тромбина/ЛПС. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 6$

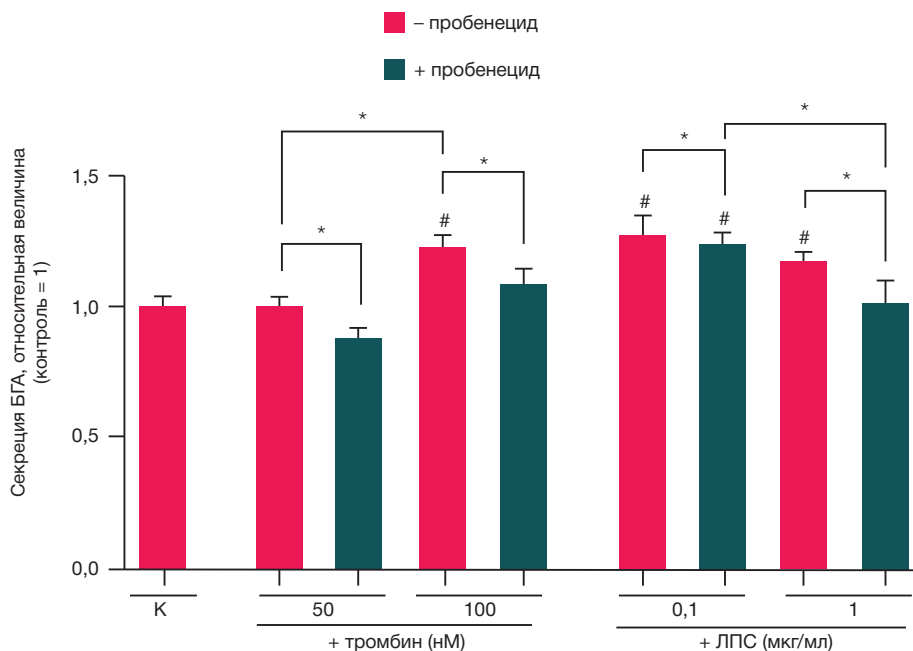


Рис. 4. Влияние блокады Panx1 на тромбин/ЛПС-вызванную секрецию БГА астроцитами мыши. Секрецию БГА оценивали через 48 ч после воздействия тромбина/ЛПС. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 6$

Влияние пробенецида на секрецию IL6 активированными астроцитами

Активация астроцитов сопряжена с секрецией провоспалительных цитокинов, в частности, IL6. Высокие концентрации тромбина и ЛПС вызвали увеличение уровня секреции IL6 через 6 ч после индукции. При этом эффект ЛПС был в 2 раза более выраженным по сравнению с действием тромбина ($p < 0,05$). Таким образом, ЛПС оказался более специфичным провоспалительным агентом. Пробененид в обоих случаях имел противовоспалительный эффект и отменял провоспалительную активацию астроцитов, вызванную как тромбином, так и ЛПС, существенно снижая уровень секреции IL6 (рис. 5), что указывает на участие Panx1 в реализации секреторной функции реактивных астроцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хроническое нейровоспаление является патогенетическим фактором, запускающим процессы нейродегенерации и повышающим риск необратимого повреждения ЦНС. Астроциты, наиболее многочисленные клетки мозга, обеспечивающие взаимодействие глии и нейронов, могут участвовать в регуляции нейровоспаления. Провоспалительная активация астроцитов сопряжена с усилением их пролиферативной и секреторной активности и может сопровождаться открытием каналов Panx1 [9].

Высвобождение АТФ из клеток, в том числе через Panx1, является сигналом для множества функций: от миграции, пролиферации и роста в физиологических условиях до запуска нейровоспаления и нейродегенерации при патологических состояниях. Эффекты АТФ реализуются

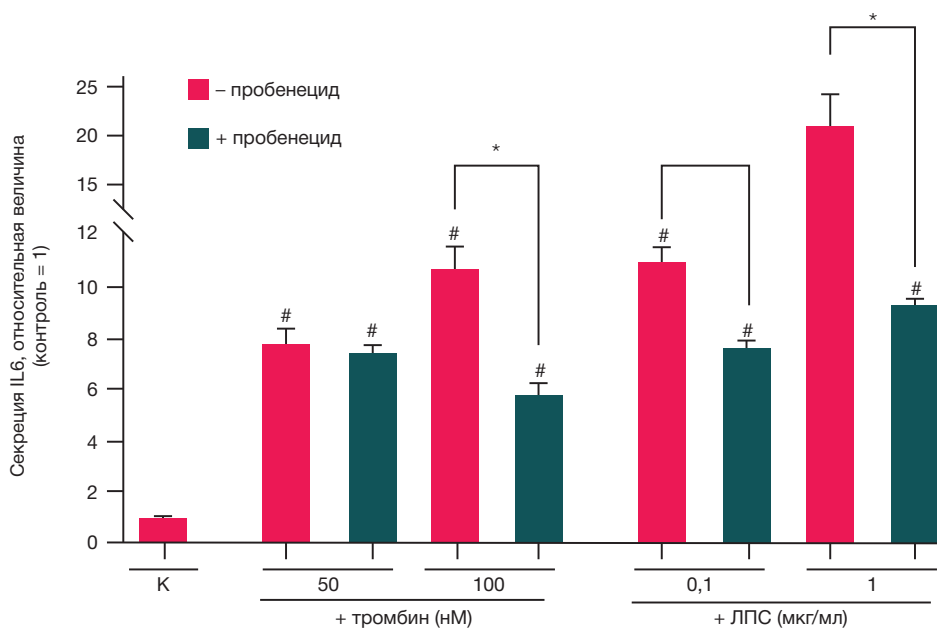


Рис. 5. Влияние блокады Panx1 на секрецию IL6 астроцитами мыши под воздействием тромбина/ЛПС в течение 6 ч. К — контроль; * — $p < 0,05$, # — $p < 0,05$ по сравнению с контролем, $n \geq 3$

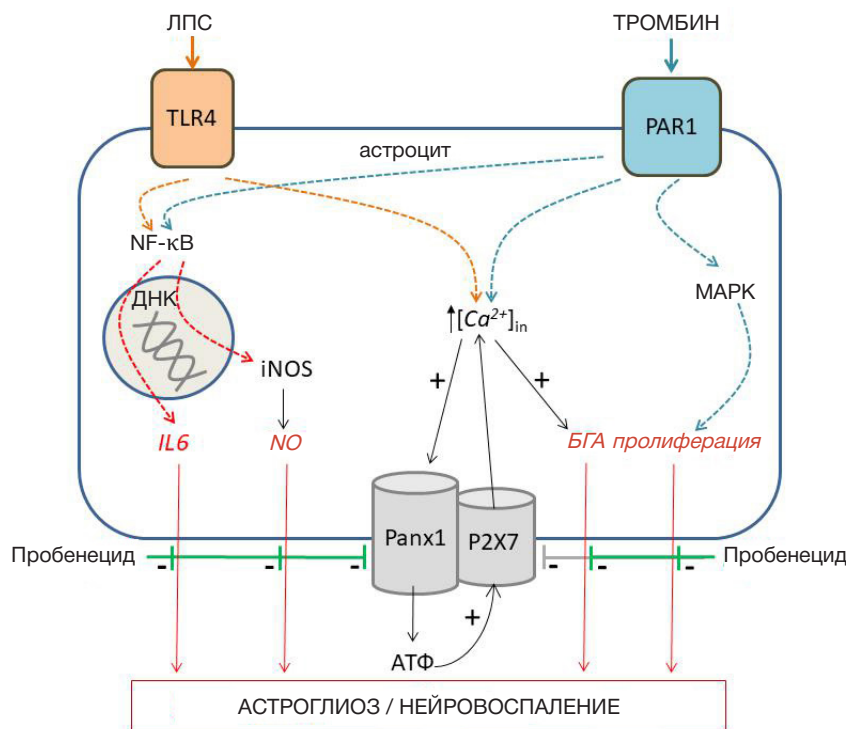


Рис. 6. Влияние пробенецида на тромбин/ЛПС-вызванную активацию астроцитов

через пуриnergические рецепторы: лиганд-управляемые ионные каналы (P2X) и метаболитные рецепторы, связанные с G-белком (P2Y). В запуске нейровоспаления важная роль принадлежит P2X7-рецепторам. Таким образом, пробенецид через блокаду Panx1 способен ограничивать высвобождение АТФ и опосредованно — пуриnergическую передачу сигналов [6]. Однако есть сведения, что пробенецид может непосредственно блокировать P2X7-рецепторы [10].

Интересно, что кооперация Panx1 с рецепторами P2Y1 и P2Y2 через PLC-каскад вызывает рост уровня Ca^{2+} в клетке, что повышает активацию Panx1 [11]. Предположительно Ca -индуцированная активация Panx1 происходит через фосфорилирование CaMKII, открытие Panx1 и высвобождение АТФ [12].

При ишемии головного мозга и развитии эксайтотоксичности происходит гиперактивация NMDAR, что активирует Panx1 и запускает проапоптотические сигналы [13]. Активация Panx1 инициирует сборку инфламмасом — мультимерных белковых комплексов в цитозоле всех клеток, которые контролируют воспалительную реакцию. Активация инфламмасы обеспечивает появление активной формы провоспалительной каспазы-1, которая расщепляет про-IL1 β и про-IL18 с образованием зрелых цитокинов IL1 β и IL18 [3, 6]. Через каспазу-1 запускается и пироптоз — провоспалительная форма гибели клеток, сопровождающаяся высвобождением провоспалительных сигналов. Высвобождение АТФ, например через Panx1, в окружающую среду и последующая активация P2X7R также ведут к активации воспалительных процессов, сборке инфламмасом и продукции IL1 β [6].

Интересно, что в системе совместного культивирования нейроны-астроциты АТФ и глутамат, высвобождаемые из астроцитов, обработанных кондиционированной средой от активированной микроглии, вызывают гибель нейронов за счет активации Panx1 нейронов [14]. Таким образом, Panx1 регулирует высвобождение АТФ и других нуклеотидов,

сборку инфламмасом и секрецию цитокинов, что может определять его вклад в развитие нейродегенерации. Поэтому Panx1 является потенциальной мишенью для фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний и острых повреждений мозга. Показано возможное сопряжение PAR1 с каналами Panx1 [15].

Нами продемонстрирован рост числа астроцитов под действием тромбина (рис. 1). Подобный эффект может быть сопряжен с тромбин/PAR1-опосредуемым фосфорилированием ERK1/2 или активацией PLC ϵ , которая в свою очередь регулирует MAPK/NF- κ B-внутриклеточный каскад [16]. Этот эффект может быть также связан с запуском тромбин/PAR1-зависимой секрецией IL6 астроцитами и передачей дальнейшего сигнала через IL6/STAT3-путь, развитием астроглиоза, в том числе увеличением уровня кислого фибриллярного белка астроцитов (GFAP) и виментина. В работе показано, что пробенецид ингибирует тромбин-опосредованный рост числа астроцитов и возвращает данный показатель к контрольным значениям, что указывает на возможность вовлечения Panx1-каналов в данный процесс. Это согласуется с данными, полученными на эпителиальных клетках легких и эндотелиоцитах человека, где продемонстрирована тромбин-зависимая активация каналов Panx1 [15, 17]. Однако механизмы подобной кооперации еще предстоит изучить.

Для моделирования воспалительного ответа в эксперименте широко применяют провоспалительный фактор ЛПС. Известно, что провоспалительную активацию клеток под действием ЛПС опосредует TLR4. Через TLR4 запускается активация всего ансамбля факторов, включая NF- κ B, через сигнальный комплекс MyD88-IRAK-TRAF6-TAK1 [18]. В результате возможны изменение пролиферации астроцитов, экспрессия провоспалительных цитокинов через активацию MAPK/NF- κ B [19]. Кроме этого, показано, что в ЛПС-опосредованном воспалении может быть задействован каскад Akt/ERK/JNK, поскольку при его блокаде снижалась секреция

провоспалительных цитокинов [20]. Существуют данные о ЛПС/TLR4-зависимом повышении уровня пролиферации астроцитов мыши.

В настоящей работе показано, что ЛПС снижает выживаемость клеток, но активирует секрецию первичных культивируемых кортикальных астроцитов мыши. Ожидается, что вызванная ЛПС активация астроцитов приводила к стойкому увеличению секреции провоспалительного интерлейкина IL6 (рис. 5) и в меньшей степени — NO и БГА (рис. 3, 4). Интересно, что блокада Pаnх1-каналов пробенецидом значимо снижала ЛПС-вызванную провоспалительную секрецию астроцитов.

Провоспалительная активация астроцитов сопровождается увеличением продукции множества хемокинов, цитокинов, а также активацией индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и секрецией NO [21, 22]. Показано, что повышение образования NO сопутствует течению многих нейродегенеративных заболеваний, например болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также может участвовать в образовании активных форм азота, оказывая цитотоксическое действие на нервные клетки [23, 24]. В астроцитах индукторами синтеза NO могут выступать как эндогенные, так и экзогенные провоспалительные факторы [21, 24]. Так, нами показано повышение секреции NO первичными астроцитами мыши под действием тромбина и ЛПС (рис. 3). Ранее на клетках астроцитомы были продемонстрированы PAR1-опосредованная секреция NO и активация iNOS [25]. Наблюдаемая нами тромбин-вызванная продукция NO культивируемыми астроцитами при блокаде Pаnх1 пробенецидом снижалась (рис. 3). Этот факт указывает на возможность кооперации тромбинового рецептора PAR1 и Pаnх1. Известно, что активацию Pаnх1-канала может индуцировать высокая концентрация внутриклеточного Ca^{2+} , которая, в свою очередь, может быть следствием активации сигнального пути тромбин/PAR1/Gq/PKC/IP3 [4]. Pаnх1-зависимый выброс АТФ через P2X7 усиливает тромбин-вызванное увеличение внутриклеточного кальция [26] и активацию nNOS и eNOS в астроцитах.

Нами показано, что ЛПС-стимулируемая секреция NO астроцитами так же, как и вызванная тромбином, отменяется в присутствии пробенецида (рис. 2). Другие исследователи наблюдали зависимость эффектов ЛПС от Pаnх1 на НК-2-клетках. Например, обнаружено облегчение течения ЛПС-индуцированного воспаления на фоне блокады Pаnх1, выраженное в ингибировании NLRP3 и снижении экспрессии Вах и Bcl2 [27].

Известно, что уровень активации иммунокомпетентных клеток (макрофагов, тучных клеток) может быть оценен по уровню секреции БГА. В нашей работе мы оценили по субстрат-ферментной реакции активность БГА в среде культивирования астроцитов через 24 и 48 ч после аппликации тромбина и ЛПС. Как в случае действия тромбина, так и ЛПС увеличение секреции БГА было более выражено через 48 ч, что, вероятно, связано с «отставленной» активацией астроцитов по принципу положительной обратной связи. Эти результаты согласуются с данными о тромбин-зависимом росте секреции БГА в тромбоцитах и тучных клетках, на которых показано вовлечение P2X7 рецепторов в активацию дегрануляции [28].

К специфичным маркерам воспаления относится провоспалительный цитокин IL6. Анализ его уровня в исследуемых нами культурах астроцитов подтвердил выраженный провоспалительный эффект как тромбина, так и, в большей степени, ЛПС (рис. 5). Подобный

провоспалительный эффект тромбина был ранее показан на астроцитах [29]. Данный эффект протеазы связывают с тромбин/PAR1-зависимой активацией белка G12/13, запускающего каскад RhoGEF/RhoA/фосфолипаза Cε — DAG и PKC — PKD, завершающийся повышением экспрессии IL6, COX-2 и других провоспалительных генов [30]. Выраженное провоспалительное действие ЛПС на астроциты с индукцией секреции IL6 было так же продемонстрировано другими исследователями [31]. Вместе с тем, в настоящем исследовании мы впервые показали пробенецид-зависимое снижение тромбин- и ЛПС-вызванной секреции IL6 на первичных культурах астроцитов (рис. 6). Z. Zhang с соавторами при сепсисе в гипотампе, а L. Wei с коллегами на клетках U87-MG наблюдали пробенецид-вызванное ингибирование экспрессии TNFα, IL6, IL1β и IL8, в том числе в присутствии ЛПС [19, 32]. В то же время существуют работы, которые не подтверждают участие Pаnх1 и потенциальных гетеродимеров P2X4/P2X7 в P2X7-зависимом высвобождении IL6, CCL2 и TNFα в микроглии [33].

В качестве потенциального нейропротектора мы исследовали эффекты пробенецида, вещества с широким спектром действия. Пробенецид свободно проникает через ГЭБ благодаря высокой растворимости в липидах. Он способен взаимодействовать с мембранными белками-каналами TRPV2 и переносчиками органических анионов (OAT1-3) и катионов (OCT1-3), а также полуканалами, образованными Pаnх1, что указывает на его потенциальное терапевтическое использование, например, в качестве адъюванта для увеличения биодоступности некоторых лекарств в ЦНС. Перспективным и интересным видится применение пробенецида в качестве блокатора полуканалов Pаnх1 для подавления нейровоспаления, являющегося нейродегенеративным компонентом многих заболеваний ЦНС [6]. Учитывая множественность активирующих Pаnх1 стимулов и полифункциональность его эффектов, важно учитывать двойственность эффектов пробенецида: с одной стороны, он может запускать провоспалительные эффекты, сдерживая активацию инфламмосом, с другой стороны, снижение глияльно-нейронального взаимодействия и пластичности повышает риск дополнительного повреждения ткани. В пользу противовоспалительного и нейропротекторного действия пробенецида указывает снижение на фоне его воздействия уровня экспрессии AQP4, NLRP3 и каспазы-1 в культуре астроцитов при кислородно-глюкозной депривации [34]. Пробенецид повышал выживаемость астроцитов через снижение продукции АФК и подавление экспрессии NLRP3, каспазы-1 и IL1β [6].

Таким образом, применение пробенецида, ингибитора Pаnх1, в качестве противовоспалительного агента (рис. 6), может представлять интерес при разработке новых направлений эффективного контроля нейровоспаления, одного из важных факторов, потенцирующих повреждение мозга при травмах и нейродегенеративных заболеваниях [35, 36].

ВЫВОДЫ

Провоспалительная активация астроцитов мышей аппликацией тромбина (50 и 100 нМ) и липополисахарида (0,1 и 1 мкг/мл) приводила к изменению их функционального профиля, сопровождающегося изменением пролиферации и секреторной активности клеток. При этом на фоне ЛПС наблюдается наиболее выраженное повышение секреции IL6, в отличие от тромбина, который оказывал более

выраженное действие на секрецию NO и пролиферацию астроцитов. Продемонстрировано, что индуцируемую этими факторами секрецию NO, БГА и IL6 отменял пробенецид, блокатор каналов Pannx1. Интересно, что пробенецид отменял влияние тромбина на пролиферацию астроцитов, но не на эффект ЛПС. Выраженность ингибирования секреции IL6 и БГА пробенецидом так же различалась на фоне ЛПС и тромбина. Полученные

результаты свидетельствуют о возможном участии каналов, образованных Pannx1, в тромбин- и липополисахарид-вызванной провоспалительной активации астроцитов и индукции астроглиоза. Однако поиск механизмов и ключевых участников сигнального каскада, запускаемого в условиях тромбин- и ЛПС-вызванного нейровоспаления на фоне предобработки клеточных культур пробенецидом, требует дальнейшего исследования.

Литература

- Choi SH, Da YL, Seung UK, Byung KJ. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: Role of microglial NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 4082–90.
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, et al. Pannexin channels in ATP release and beyond: An unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cellular Signalling*. 2011; 23: 305–16.
- Koval M, Cwiek A, Carr T, Good ME, Lohman AW, Isakson BE. Pannexin 1 as a driver of inflammation and ischemia–reperfusion injury. *Purinergic Signalling*. 2021; 17: 521–31.
- Galkov MD, Surin AM, Lisina OYu, Gorbacheva LR. Neurodegeneration and Neuroinflammation: The Role of Pannexin 1. *Neurochemical Journal*. 2023; 17: 727–39.
- Rusiecka OM, Tournier M, Molica F, Kwak BR. Pannexin1 channels — a potential therapeutic target in inflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 1020826.
- García-Rodríguez C, Mujica P, Illanes-González J, López A, Vargas C, Sáez JC, et al. Probenecid, an Old Drug with Potential New Uses for Central Nervous System Disorders and Neuroinflammation. *Biomedicines*. 2023; 11.
- Иванова А. Е., Горбачева Л. Р., Струкова С. М., Пинелис В. Г., Райзер Г. Участие активированного протеина С и тромбина в регуляции функций астроцитов. *Биол мембраны*. 2013; 30: 387–97.
- Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic Release of β -Hexosaminidase and β -Glucuronidase from Purified Rat Serosal Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 1979; 123: 1445–50.
- Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta — Biomembranes*. 2013; 1828: 15–22.
- Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildrejorde M, Skarratt KK, Fuller SJ, et al. Probenecid Blocks Human P2X7 Receptor-Induced Dye Uptake via a Pannexin-1 Independent Mechanism. *PLoS ONE*. 2014; 9: e93058.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Letters*. 2006; 580: 239–44.
- Yang K, Xiao Z, He X, Weng R, Zhao X, Sun T. Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23.
- Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2010; 47: 122–9.
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 118: 826–40.
- Gödecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Gödecke A, Schrader J. Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302: 915–23.
- Chen X, Zhang H, Hao H, Zhang X, Song H, He B, et al. Thrombin induces morphological and inflammatory astrocytic responses via activation of PAR1 receptor. *Cell Death Discovery*. 2022; 8.
- Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L, O'Neal W, Trejo JA, Boucher RC, et al. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 20638–48.
- Fiebich BL, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018; 12.
- Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, et al. Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation*. 2019; 42: 1082–92.
- Yu D-K, Lee B, Kwon M, Yoon N, Shin T, Kim N-G, et al. Phlorofucofuroeckol B suppresses inflammatory responses by down-regulating nuclear factor κ B activation via Akt, ERK, and JNK in LPS-stimulated microglial cells. *International Immunopharmacology*. 2015; 28: 1068–75.
- Kozuka N, Itofusa R, Kudo Y, Morita M. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production. *J of Neuroscience Research*. 2005; 82: 717–28.
- Chen Q, Liang Z, Yue Q, Wang X, Siu SWI, Pui-Man Hoi M, et al. A Neuropeptide Y/F-like Polypeptide Derived from the Transcriptome of *Turbinaria peltata* Suppresses LPS-Induced Astrocytic Inflammation. *J Nat Prod*. 2022; 85: 1569–80.
- Liu B, Gao H-M, Wang J-Y, Jeohn G-H, Cooper CL, Hong J-S. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 962: 318–31.
- Li T, Xu T, Zhao J, Gao H, Xie W. Depletion of iNOS-positive inflammatory cells decelerates neuronal degeneration and alleviates cerebral ischemic damage by suppressing the inflammatory response. *Free Radic Biol Med*. 2022; 181: 209–20.
- Boven LA, Vergnolle N, Henry SD, Silva C, Imai Y, Holden J, et al. Up-Regulation of Proteinase-Activated Receptor 1 Expression in Astrocytes During HIV Encephalitis. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 2638–46.
- Isakson BE, Thompson RJ. Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signaling. *Channels*. 2014; 8: 118–23.
- Huang G, Bao J, Shao X, Zhou W, Wu B, Ni Z, et al. Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis. *Life Sciences*. 2020; 254.
- Wareham KJ, Seward EP. P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. *Purinergic Signalling*. 2016; 12: 235–46.
- Ponath G, Park C, Pitt D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9.
- Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*. 2004; 76 (2): 265–76.
- Krasovska V, Doering LC. Regulation of IL6 secretion by astrocytes via TLR4 in the fragile X mouse model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018; 11: 272.
- Wei L, Sheng H, Chen L, Hao B, Shi X, Chen Y. Effect of pannexin-1 on the release of glutamate and cytokines in astrocytes. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016; 23: 135–41.
- Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, van Calker D, Biber K. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia. *GLIA*. 2014; 62: 592–607.
- Jian Z, Ding S, Deng H, Wang J, Yi W, Wang L, et al. Probenecid protects against oxygen–glucose deprivation injury in primary

- astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain Research*. 2016; 1643: 123–9.
35. Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C. Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation*. 2016; 39: 123–8.
36. Wang Q, Li H, Ling Z, Chen G, Wei Z-Y. Inhibition of Schwann cell pannexin 1 attenuates neuropathic pain through the suppression of inflammatory responses. *J Neuroinflammation*. 2022; 19: 244.

References

- Choi SH, Da YL, Seung UK, Byung KJ. Thrombin-induced oxidative stress contributes to the death of hippocampal neurons in vivo: Role of microglial NADPH oxidase. *Journal of Neuroscience*. 2005; 25: 4082–90.
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, et al. Pannexin channels in ATP release and beyond: An unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. *Cellular Signalling*. 2011; 23: 305–16.
- Koval M, Cwiek A, Carr T, Good ME, Lohman AW, Isakson BE. Pannexin 1 as a driver of inflammation and ischemia–reperfusion injury. *Purinergic Signalling*. 2021; 17: 521–31.
- Galkov MD, Surin AM, Lisina OYu, Gorbacheva LR. Neurodegeneration and Neuroinflammation: The Role of Pannexin 1. *Neurochemical Journal*. 2023; 17: 727–39.
- Rusiecka OM, Tournier M, Molica F, Kwak BR. Pannexin1 channels — a potential therapeutic target in inflammation. *Front Cell Dev Biol*. 2022; 10: 1020826.
- García-Rodríguez C, Mujica P, Illanes-González J, López A, Vargas C, Sáez JC, et al. Probenecid, an Old Drug with Potential New Uses for Central Nervous System Disorders and Neuroinflammation. *Biomedicines*. 2023; 11.
- Ivanova AE, Gorbacheva LR, Strukova SM, Pinelic VG, Rajzer G. Uchastie aktivirovannogo proteina S i trombina v regulaciji funkcij astrocitov. *Biol membrany*. 2013; 30: 387–97.
- Schwartz LB, Austen KF, Wasserman SI. Immunologic Release of β -Hexosaminidase and β -Glucuronidase from Purified Rat Serosal Mast Cells. *The Journal of Immunology*. 1979; 123: 1445–50.
- Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta — Biomembranes*. 2013; 1828: 15–22.
- Bhaskaracharya A, Dao-Ung P, Jalilian I, Spildrejrde M, Skarratt KK, Fuller SJ, et al. Probenecid Blocks Human P2X7 Receptor-Induced Dye Uptake via a Pannexin-1 Independent Mechanism. *PLoS ONE*. 2014; 9: e93058.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Letters*. 2006; 580: 239–44.
- Yang K, Xiao Z, He X, Weng R, Zhao X, Sun T. Mechanisms of Pannexin 1 (PANX1) Channel Mechanosensitivity and Its Pathological Roles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23.
- Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*. 2010; 47: 122–9.
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *Journal of Neurochemistry*. 2011; 118: 826–40.
- Gödecke S, Roderigo C, Rose CR, Rauch BH, Gödecke A, Schrader J. Thrombin-induced ATP release from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012; 302: 915–23.
- Chen X, Zhang H, Hao H, Zhang X, Song H, He B, et al. Thrombin induces morphological and inflammatory astrocytic responses via activation of PAR1 receptor. *Cell Death Discovery*. 2022; 8.
- Seminario-Vidal L, Kreda S, Jones L, O'Neal W, Trejo JA, Boucher RC, et al. Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of Rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 20638–48.
- Fiebich BL, Batista CRA, Saliba SW, Yousif NM, de Oliveira ACP. Role of microglia TLRs in neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018; 12.
- Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, et al. Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation*. 2019; 42: 1082–92.
- Yu D-K, Lee B, Kwon M, Yoon N, Shin T, Kim N-G, et al. Phlorofucofuroeckol B suppresses inflammatory responses by down-regulating nuclear factor κ B activation via Akt, ERK, and JNK in LPS-stimulated microglial cells. *International Immunopharmacology*. 2015; 28: 1068–75.
- Kozuka N, Itofusa R, Kudo Y, Morita M. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines require different astrocyte states to induce nitric oxide production. *J of Neuroscience Research*. 2005; 82: 717–28.
- Chen Q, Liang Z, Yue Q, Wang X, Siu SWI, Pui-Man Hoi M, et al. A Neuropeptide Y/F-like Polypeptide Derived from the Transcriptome of *Turbinaria peltata* Suppresses LPS-Induced Astrocytic Inflammation. *J Nat Prod*. 2022; 85: 1569–80.
- Liu B, Gao H-M, Wang J-Y, Jeohn G-H, Cooper CL, Hong J-S. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 962: 318–31.
- Li T, Xu T, Zhao J, Gao H, Xie W. Depletion of iNOS-positive inflammatory cells decelerates neuronal degeneration and alleviates cerebral ischemic damage by suppressing the inflammatory response. *Free Radic Biol Med*. 2022; 181: 209–20.
- Boven LA, Vergnolle N, Henry SD, Silva C, Imai Y, Holden J, et al. Up-Regulation of Proteinase-Activated Receptor 1 Expression in Astrocytes During HIV Encephalitis. *The Journal of Immunology*. 2003; 170: 2638–46.
- Isakson BE, Thompson RJ. Pannexin-1 as a potentiator of ligand-gated receptor signaling. *Channels*. 2014; 8: 118–23.
- Huang G, Bao J, Shao X, Zhou W, Wu B, Ni Z, et al. Inhibiting pannexin-1 alleviates sepsis-induced acute kidney injury via decreasing NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis. *Life Sciences*. 2020; 254.
- Wareham KJ, Seward EP. P2X7 receptors induce degranulation in human mast cells. *Purinergic Signalling*. 2016; 12: 235–46.
- Ponath G, Park C, Pitt D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9.
- Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*. 2004; 76 (2): 265–76.
- Krasovska V, Doering LC. Regulation of IL6 secretion by astrocytes via TLR4 in the fragile X mouse model. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018; 11: 272.
- Wei L, Sheng H, Chen L, Hao B, Shi X, Chen Y. Effect of pannexin-1 on the release of glutamate and cytokines in astrocytes. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2016; 23: 135–41.
- Shieh CH, Heinrich A, Serchov T, van Calker D, Biber K. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL6, CCL2, and TNF- α in cultured mouse microglia. *GLIA*. 2014; 62: 592–607.
- Jian Z, Ding S, Deng H, Wang J, Yi W, Wang L, et al. Probenecid protects against oxygen–glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain Research*. 2016; 1643: 123–9.
- Hainz N, Wolf S, Tschernig T, Meier C. Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation*. 2016; 39: 123–8.
- Wang Q, Li H, Ling Z, Chen G, Wei Z-Y. Inhibition of Schwann cell pannexin 1 attenuates neuropathic pain through the suppression of inflammatory responses. *J Neuroinflammation*. 2022; 19: 244.

ГЛУБОКОЕ ОБУЧЕНИЕ В МОДЕЛИРОВАНИИ БЕЛОК-ЛИГАНДНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ: НОВЫЕ ПУТИ В РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

А. Д. Барыкин^{1,2}, Т. В. Чепурных¹, З. М. Осипова^{1,3} ✉

¹ Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Технологии глубокого обучения стали драйвером революционных изменений в научных исследованиях разных областей. Наиболее ярким примером их применения в области структурной биологии и биомедицины является программная разработка нейросеть AlphaFold-2, решившая полувековую проблему предсказания 3D-структуры белков по первичной аминокислотной последовательности. Использование методов глубокого обучения для предсказания белок-лигандных взаимодействий сможет значительно упростить предсказание, ускорить разработку новых эффективных лекарственных препаратов и поменять концепцию драг-дизайна.

Ключевые слова: докинг, белок-лигандное взаимодействие, алгоритм нейросети, глубокое обучение

Финансирование: исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-44-02024, <https://rscf.ru/project/22-44-02024/>.

Вклад авторов: А. Д. Барыкин — анализ литературы, написание рукописи, Т. В. Чепурных — идея, анализ литературы, написание и редактирование рукописи, З. М. Осипова — руководство проектом, редактирование рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Зинаида Михайловна Осипова
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, Россия; zkaskova@ibch.ru

Статья получена: 06.12.2023 **Статья принята к печати:** 22.01.2024 **Опубликована онлайн:** 08.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.002

DEEP LEARNING IN MODELLING THE PROTEIN-LIGAND INTERACTION: NEW PATHWAYS IN DRUG DEVELOPMENT

Barykin AD^{1,2}, Chepurnykh TV¹, Osipova ZM^{1,3} ✉

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (MIPT), Dolgoprudny, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The deep learning technologies have become the driver of the revolutionary changes in scientific research in various fields. The AlphaFold-2 neural network software development that has solved the semicentennial problem of 3D protein structure prediction based on primary amino acid sequence is the most obvious example of using such technologies in structural biology and biomedicine. The use of deep learning methods for the prediction of protein-ligand interactions can considerably simplify predicting, speed up the development of new effective pharmaceuticals and change the concept of drug design.

Keywords: docking, protein-ligand interaction, neural networks, deep learning

Funding: the study was supported by the Russian Science Foundation grant, project № 22-44-02024 (<https://rscf.ru/project/22-44-02024/>).

Author contribution: Barykin AD — literature review, manuscript writing, Chepurnykh TV — concept, literature review, manuscript writing and editing, Osipova ZM — project management, manuscript editing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Zinaida M. Osipova
Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997, Russia; zkaskova@ibch.ru

Received: 06.12.2023 **Accepted:** 22.01.2024 **Published online:** 08.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.002

Компьютерное (*in silico*) моделирование белок-лигандного взаимодействия играет ключевую роль в биомедицинских исследованиях и является одной из фундаментальных задач в современном процессе разработки новых лекарственных препаратов. Чем более аффинно и избирательно биоактивная молекула связывается с рецептором или ферментом, тем более эффективным и безопасным будет итоговый лекарственный кандидат. Достоверность моделирования определяет количество и качество молекул-кандидатов, которые будут проходить дорогостоящую процедуру химического синтеза и испытаний *in vitro* и *in vivo*. Стадия моделирования часто является ключевой: от нее в большой степени будут зависеть время, стоимость разработки и конечная цена лекарства [1]. Высокоэффективного метода биоинформатической автоматизированной оценки белок-лигандного взаимодействия до недавнего времени не существовало.

Классические методы компьютерного моделирования

Молекулярный докинг — метод молекулярного моделирования, предсказывающий наилучшее положение лиганда относительно белка-мишени, который использует их трехмерные структуры и оценочные функции энергии взаимодействия молекул (scoring functions). Обучение оценочных функций (рис. 1А) обычно происходит на основе набора экспериментально определенной аффинности связывания белка с лигандами, похожими на изучаемый. Правильность прогноза, таким образом, будет напрямую зависеть от степени сходства нового изучаемого кандидата и известных лигандов из базы данных.

Большое разнообразие оценочных функций можно объяснить недостаточной надежностью каждой из них в случае решения конкретной задачи. Разные оценочные функции лучше подходят для разных классов лигандов, но даже в случае правильного подбора метода не существует

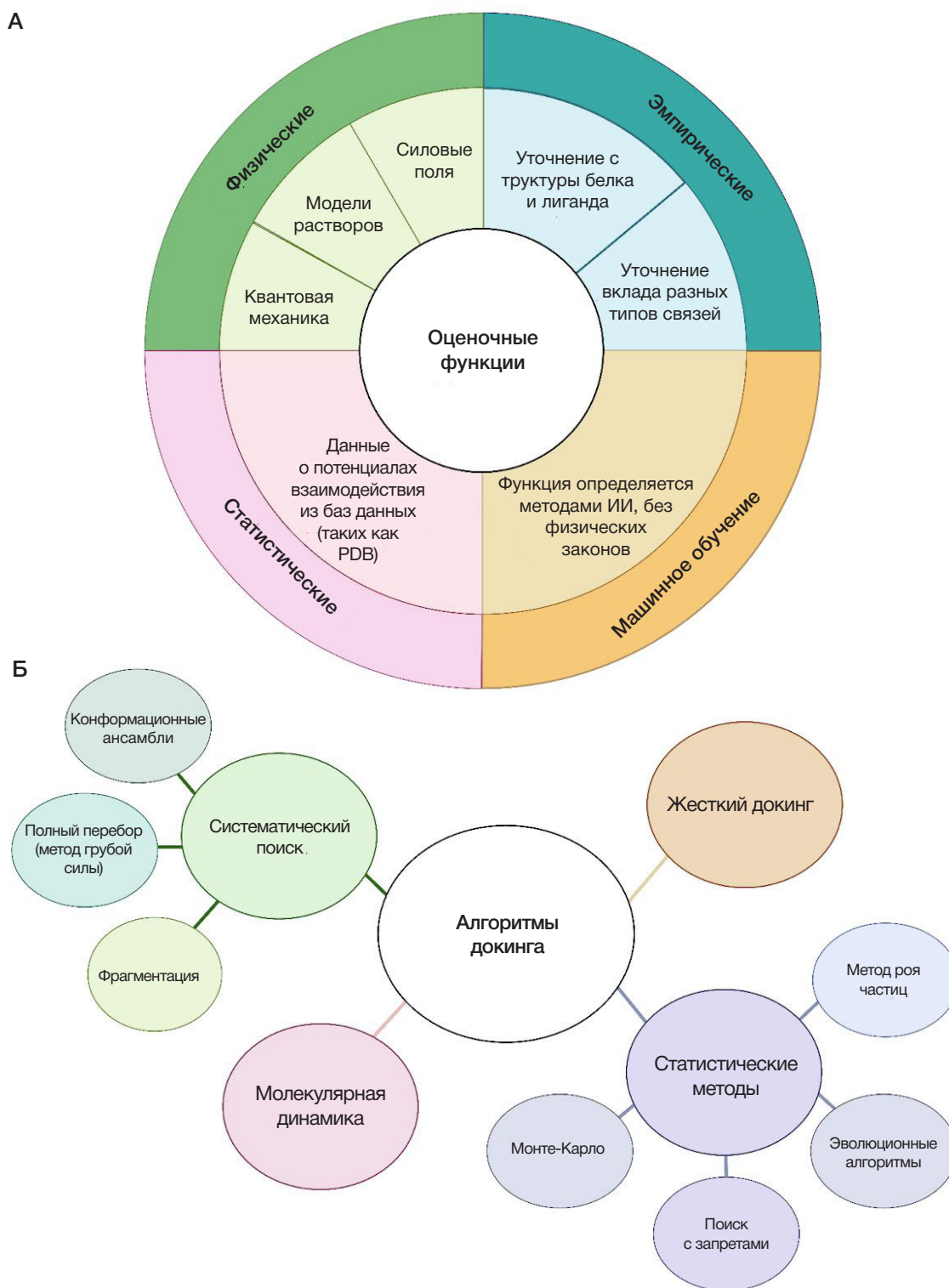


Рис. 1. Алгоритмы молекулярного докинга. **А.** Виды оценочных функций для молекулярного докинга. **Б.** Варианты алгоритмов молекулярного докинга и молекулярная динамика

абсолютной гарантии результата. Поэтому консенсусное оценивание (использование данных сразу нескольких оценочных функций) повышает вероятность успеха докинга [2].

В случае «жесткого» докинга алгоритмы рассматривают молекулу лиганда и мишени как твердые тела, в случае «динамического» докинга программы допускают возможность конформационных изменений в лиганде при его связывании. Методы, лежащие в основе алгоритмов докинга (рис. 1Б), можно условно разделить

на систематические и статистические. Систематические методы разбивают молекулу лиганда на несколько частей, что позволяет оценивать аффинность взаимодействия каждой части, а затем части ковалентно «сшивают», чтобы «пересобрать» лиганд. Статистические методы для поиска глобального минимума энергии генерируют случайные изменения, для каждого из которых оценивается термодинамическое состояние [3]. К статистическим относят метод Монте-Карло, поиск с запретами, метод «роя частиц» и эволюционные алгоритмы. Систематические

алгоритмы гарантируют достижение результата за конечное число шагов (как правило, очень большое), статистические могут «пропустить» искомое энергетическое состояние. Однако на практике статистические алгоритмы часто показывают более достоверные результаты, чем систематические.

За последние два десятилетия возникли десятки бесплатных и коммерческих программ для молекулярного докинга: DOCK, AutoDock, Surflex, LigandFit, MCDock, LeDock, AutoDock Vina, rDock, UCSF Dock и многие другие [4]. Обычно программы используют сразу несколько алгоритмов, позволяя адаптировать докинг под конкретные пары фермент–лиганд.

В большинстве случаев методы современного белок–лигандного докинга верно определяют сайт и механизм связывания лиганда, но не могут установить его аффинность с достаточной точностью [5]. Это значительно снижает применимость метода для поиска новых лекарственных средств, поскольку подбор молекул-кандидатов осуществляется именно по величине энергии связывания.

Метод молекулярной динамики (МД) основан на использовании уравнений движения атомов и эмпирических функций потенциальной энергии для расчета межатомных взаимодействий и описания эволюции молекулярной системы во времени. Взаимодействия между атомами включают упругие взаимодействия (соответствующие ковалентным химическим связям) и силы Ван-дер-Ваальса. Наиболее важные методы постобработки для расчета свободной энергии связи комплекса взаимодействия белка и лиганда используют также принципы молекулярной механики с применением уравнения Пуассона–Больцмана / обобщенной модели Борна, а также дополнительные подходы, такие как термодинамическая интеграция и свободный анализ [6].

Основным ограничением в методе молекулярной динамики является длина молекулярной траектории, которая задается количеством шагов симуляции. Временной шаг симуляции должен быть сопоставим с самыми быстрыми движениями в системе, а именно колебаниями связей (1–2 фс). Таким образом, для моделирования медленных процессов, например движения больших доменов и связывания (мкс–мс), требуется большое число шагов МД, что значительно увеличивает объем вычислений. Поэтому наблюдение фактического связывания белка с лигандом — очень редкое явление [7]. Ожидалось, что МД-моделирование, основанное на расчетах сродства связывания с использованием молекулярной механики при использовании уравнения Пуассона–Больцмана, внесет значительный вклад в решение реальных проблем, таких как идентификация самых выгодных комбинаций для пар «белок–лиганд» с их последующей оптимизацией.

Глубокое обучение: новая глава в моделировании белок–лигандных взаимодействий

Первые методы глубокого обучения появились в середине 1960-х, однако обрели популярность только к середине 2000-х гг. с возрастанием вычислительных мощностей и появлением объемных наборов экспериментальных данных. В настоящее время применение технологий глубокого обучения к задачам в различных сферах дало результаты, не уступающие, а иногда и превосходящие результаты традиционных методов. Самый яркий пример — создание алгоритма AlphaFold-2, предсказывающего

третичную структуру белка по первичной аминокислотной последовательности в течение всего лишь нескольких минут [8], что стало революцией в области структурной биологии.

Модели глубокого обучения были предложены для прогнозирования белок–лигандного взаимодействия в качестве альтернативы традиционному докингу, основанному на поиске минимума свободной энергии [9]. Преимущество глубокого обучения заключается в возможности изучать белок–лигандное взаимодействие непосредственно из пространственного расположения атомов, минуя выбор математических параметров, которые не всегда отражают реальный механизм связывания. Этот метод предсказания белок–лигандного взаимодействия в настоящее время претерпевает бурное развитие: опубликованная в 2017 г. нейросетевая модель DEEPsite [10] на определенном наборе данных корректно определила 23,8% сайтов связывания лигандов, а опубликованная в 2020 г. нейросеть Kalasanty на той же выборке показала результат 44,6%. PUPResNet в 2021 г. значительно улучшила результаты предсказаний (53% успеха у PUPResNet против 51% у Kalasanty) [11].

К данному моменту разработано множество разнообразных алгоритмов работы и обучения нейронных сетей (рис. 2). При исследовании белок–лигандных взаимодействий обычно применяют сверточные нейронные сети (CNN), графовые нейронные сети (GNN) и сети-трансформеры. Сверточные нейросети рассматривают парные взаимоотношения между атомами через их взаимное расположение в пространстве. Принцип работы графовых нейросетей основан на учете пороговых значений для определения типа взаимодействия между атомами (ковалентное или нековалентное). Потенциальным преимуществом такого подхода является использование меньшего количества параметров. Используют также комбинации нескольких алгоритмов или добавляют иные модули (например, denoising autoencoder, удаляющий шум), которые улучшают конечный результат [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди разных архитектур нейросетей пока не выявлен однозначный лидер: точность результата каждого алгоритма зависит от типа белков и лигандов, аффинности и механизма связывания. Согласно последним данным, графические нейросети egGNN и saCNN оказались наиболее успешными в предсказании аффинности лигандов [13, 14], однако отличие от сверточных нейросетей не является критическим. По нашему мнению, это связано с тем, что оптимальный предсказательный алгоритм пока не разработан. Создание такого алгоритма, судя по скорости развития ИИ в вычислительной биологии, — это, скорее всего, вопрос нескольких лет, а не десятилетий. Так же, как AlphaFold-2 в 2020 г. изменил парадигму в области изучения структуры белка, так и искусственный интеллект в биомедицинских исследованиях открывает новую главу в фармацевтике и драг-дизайне.

Перспективность использования ИИ для поиска лекарственных препаратов уже стала очевидна для индустрии, поскольку его применение существенно ускоряет и удешевляет классический двенадцатилетний цикл разработки нового лекарства. За последние пять лет почти все крупные фармкомпании объявили о партнерстве с ведущими ИИ-компаниями (Sanofi — Aily Labs, Pfizer — IBM, Novartis — Microsoft, AstraZeneca —

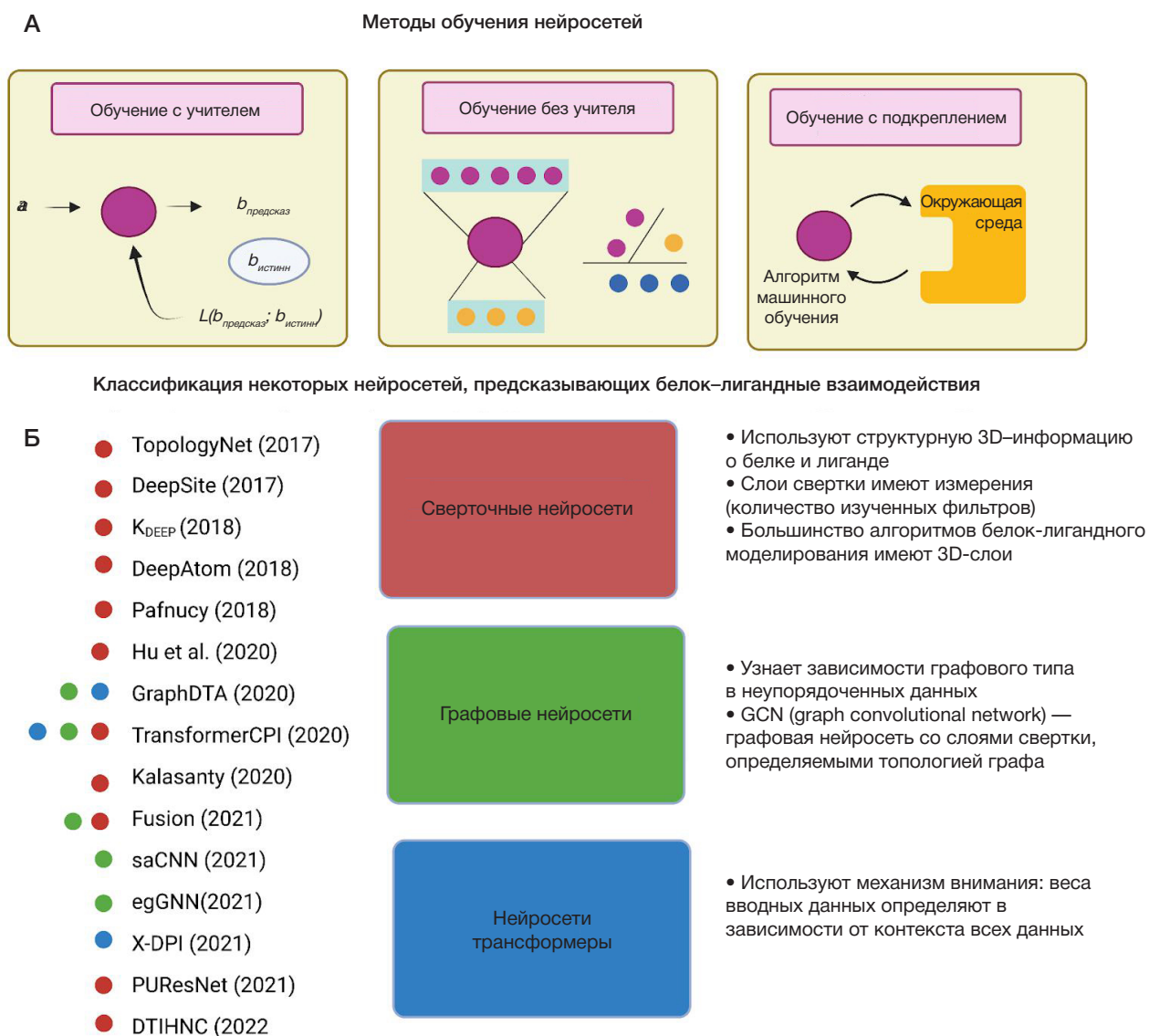


Рис. 2. Алгоритмы работы нейросетей. А. Методы обучения нейросетей. Б. Основные виды нейросетей, предсказывающих белок–лигандные взаимодействия

Venevolent и др.). Детали исследований, вероятно, еще долго будут защищены коммерческой тайной, однако регулярно выходят пресс-релизы, свидетельствующие о внедрении глубокого обучения в текущие R&D-процессы. Кроме того, появляется все больше сообщений об успехе лекарственных кандидатов, разработанных с помощью ИИ, которые готовятся к прохождению или находятся в клинических испытаниях. Примерами таковых являются халицин (перспективный антибиотик широкого действия, доклинические исследования) [15], INS018_055 (препарат от идиопатического легочного фиброза, 2-я стадия клинических испытаний), REC-2282, REC-994, REC-4881, BEN-2293, EXS-21546, RLY-4008, EXS-4318, BEN-8744 и др. [16].

Мы считаем, что в ближайшем будущем поиск пула новых биоактивных молекул кардинально ускорится, а глубокое обучение станет обязательной частью процесса разработки новых лекарственных препаратов. Тем не менее, до сих пор одной из актуальных проблем на пути к повсеместному применению глубокого обучения при поиске лекарств остается грамотный подбор данных, используемых для обучения нейросетевой модели, поскольку от их качества критически зависит достоверность ее предсказаний. В связи с этим задача максимально эффективного обучения на неполных или небольших наборах данных остается главным вызовом перед ИИ в сфере разработки лекарств [17].

Литература

1. Lazo JS. Rear-view mirrors and crystal balls: a brief reflection on drug discovery. *Mol Interv.* 2008; 8 (2): 60–3. DOI: 10.1124/mi.8.2.1.
2. Blanes-Mira C, Fernández-Aguado P, de Andrés-López J, Fernández-Carvajal A, Ferrer-Montiel A, Fernández-Ballester G. Comprehensive survey of consensus docking for high-throughput virtual screening. *Molecules.* 2023; 28 (1): 175. DOI: 10.3390/molecules28010175.
3. Zhao L, Zhu Y, Wang J, Wen N, Wang C, Cheng L. A brief review of protein–ligand interaction prediction. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022; 20: 2831–8. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.06.004.
4. Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev.* 2017; 9: 91–102. DOI: 10.1007/s12575-017-0500-0.

- 10.1007/s12551-016-0247-1. PubMed PMID: 28510083.
- Wang Z, Sun H, Yao X, Li D, Xu L, Li Y, et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys Chem Chem Phys*. 2016; 18: 12964–75. DOI: 10.1039/c6cp01555g.
 - Perez JJ, Perez RA, Perez A. Computational modeling as a tool to investigate PPI: from drug design to tissue engineering. *Front Mol Biosci*. 2021; 8: 681617. DOI: 10.3389/fmolb.2021.681617. PubMed PMID: 34095231.
 - Santos LHS, Ferreira RS, Caffarena ER. Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations. *Methods Mol Biol*. 2019; 2053: 13–34. DOI: 10.3389/fmolb.2021.681617.
 - Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021; 596: 583–9. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.
 - Crampon K, Giorkallos A, Deldossi M, Baud S, Steffanel LA. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. *Drug Discov Today*. 2021; 27(1): 151–64. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.09.007.
 - Jiménez J, Doerr S, Martínez-Rosell G, Rose AS, De Fabritiis G. DeepSite: protein-binding site predictor using 3D-convolutional neural networks. *Bioinformatics*. 2017; 33 (19): 3036–42. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx350.
 - Kandel J, Tayara H, Chong KT. PURESNet: prediction of protein–ligand binding sites using deep residual neural network. *J Cheminform*. 2021; 13: 65. DOI: 10.1186/s13321-021-00547-7.
 - Greener JG, Kandathil SM, Moffat L, Jones DT. A guide to machine learning for biologists. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022; 23: 40–55. DOI: 10.1038/s41580-021-00407-0.
 - Wang Y, Jiao Q, Wang J, Cai X, Zhao W, Cui X. Prediction of protein–ligand binding affinity with deep learning. *Comput Struct Biotechnol J*. 2023; 21: 5796–806. DOI: 10.1016/j.csbj.2023.11.009.
 - Zhao L, Zhu Y, Wang J, Wen N, Wang C, Cheng L. A brief review of protein–ligand interaction prediction. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022; 20: 2831–8. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.06.004.
 - Stokes JM, Yang K, Swanson K, Jin W, Cubillos-Ruiz A, Donghia NM, et al. A deep learning approach to antibiotic discovery. *Cell*. 2020; 180: P688–702.E13. DOI: 10.1016/j.cell.2020.01.021.
 - Arnold C. Inside the nascent industry of AI-designed drugs. *Nat Med*. 2023; 29: 1292–5. DOI: 10.1038/s41591-023-02361-0.
 - Yang B, Li K, Zhong X, Zou J. Implementation of deep learning in drug design. *MedComm — Fut Med*. 2022; 1: e18. DOI: 10.1002/mef2.18.

References

- Lazo JS. Rear-view mirrors and crystal balls: a brief reflection on drug discovery. *Mol Interv*. 2008; 8 (2): 60–3. DOI: 10.1124/mi.8.2.1.
- Blanes-Mira C, Fernández-Aguado P, de Andrés-López J, Fernández-Carvajal A, Ferrer-Montiel A, Fernández-Ballester G. Comprehensive survey of consensus docking for high-throughput virtual screening. *Molecules*. 2023; 28 (1): 175. DOI: 10.3390/molecules28010175.
- Zhao L, Zhu Y, Wang J, Wen N, Wang C, Cheng L. A brief review of protein–ligand interaction prediction. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022; 20: 2831–8. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.06.004.
- Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J. Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev*. 2017; 9: 91–102. DOI: 10.1007/s12551-016-0247-1. PubMed PMID: 28510083.
- Wang Z, Sun H, Yao X, Li D, Xu L, Li Y, et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys Chem Chem Phys*. 2016; 18: 12964–75. DOI: 10.1039/c6cp01555g.
- Perez JJ, Perez RA, Perez A. Computational modeling as a tool to investigate PPI: from drug design to tissue engineering. *Front Mol Biosci*. 2021; 8: 681617. DOI: 10.3389/fmolb.2021.681617. PubMed PMID: 34095231.
- Santos LHS, Ferreira RS, Caffarena ER. Integrating molecular docking and molecular dynamics simulations. *Methods Mol Biol*. 2019; 2053: 13–34. DOI: 10.3389/fmolb.2021.681617.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021; 596: 583–9. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- Crampon K, Giorkallos A, Deldossi M, Baud S, Steffanel LA. Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. *Drug Discov Today*. 2021; 27(1): 151–64. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.09.007.
- Jiménez J, Doerr S, Martínez-Rosell G, Rose AS, De Fabritiis G. DeepSite: protein-binding site predictor using 3D-convolutional neural networks. *Bioinformatics*. 2017; 33 (19): 3036–42. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx350.
- Kandel J, Tayara H, Chong KT. PURESNet: prediction of protein–ligand binding sites using deep residual neural network. *J Cheminform*. 2021; 13: 65. DOI: 10.1186/s13321-021-00547-7.
- Greener JG, Kandathil SM, Moffat L, Jones DT. A guide to machine learning for biologists. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022; 23: 40–55. DOI: 10.1038/s41580-021-00407-0.
- Wang Y, Jiao Q, Wang J, Cai X, Zhao W, Cui X. Prediction of protein–ligand binding affinity with deep learning. *Comput Struct Biotechnol J*. 2023; 21: 5796–806. DOI: 10.1016/j.csbj.2023.11.009.
- Zhao L, Zhu Y, Wang J, Wen N, Wang C, Cheng L. A brief review of protein–ligand interaction prediction. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022; 20: 2831–8. DOI: 10.1016/j.csbj.2022.06.004.
- Stokes JM, Yang K, Swanson K, Jin W, Cubillos-Ruiz A, Donghia NM, et al. A deep learning approach to antibiotic discovery. *Cell*. 2020; 180: P688–702.E13. DOI: 10.1016/j.cell.2020.01.021.
- Arnold C. Inside the nascent industry of AI-designed drugs. *Nat Med*. 2023; 29: 1292–5. DOI: 10.1038/s41591-023-02361-0.
- Yang B, Li K, Zhong X, Zou J. Implementation of deep learning in drug design. *MedComm — Fut Med*. 2022; 1: e18. DOI: 10.1002/mef2.18.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ПРЕЭКЛАМПСИИ НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОСОМНЫХ БЕЛКОВ SUMO

В. А. Гусар [✉], А. В. Тимофеева, И. С. Федоров, А. М. Тарасова, Ю. В. Сухова, Т. Ю. Иванец

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

Клеточная реакция на стресс, лежащий в основе сосудистой дисфункции плаценты, находится под контролем сумоилирования. Следовательно, SUMO-гомеостаз тесно связан с поддержанием ангиогенного баланса, нарушение которого характерно для преэклампсии (ПЭ). Цель работы — поиск экзосомных маркеров подобного нарушения. Оценивали экспрессию и прогностический потенциал экзосомных SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 у 39 беременных (когорта I) в первом триместре с помощью вестерн-блоттинга. В когорте II (27 беременных) оценивали экспрессию данных белков в плаценте на момент родов. Экспрессия экзосомных конъюгированных форм значимо изменялась у беременных с ранней (SUMO 1, $p = 0,03$; SUMO 2/3/4, $p = 0,03$) и поздней ПЭ (SUMO 1, $p = 0,03$; SUMO 2/3/4, $p = 0,04$; UBC9 и hnRNPA2/B1, $p < 0,0001$ соответственно), что может быть обусловлено функциональной специфичностью изоформ SUMO в контексте их субклеточных мишеней при воздействии стрессовых стимулов. В плаценте также обнаружены значимые изменения экспрессии конъюгированных форм данных белков. При ранней ПЭ установлены значимые корреляционные связи экспрессии экзосомных SUMO 2/3/4 ($r = -0,59$; $p = 0,01$) и UBC9 ($r = -0,88$; $p = 0,0001$) с уровнем PIGF, а при поздней ПЭ — hnRNPA2/B1 ($r = -0,48$; $p = 0,03$), UBC9 ($r = -0,48$; $p = 0,03$) с β -ХГЧ, и SUMO 2/3/4 ($r = -0,60$; $p = 0,006$) с концентрацией PAPP-A в сыворотке крови беременных. Анализируемые белки достоверно коррелировали с пульсационным индексом маточной артерии (SUMO 1 ($r = 0,59$; $p = 0,01$), SUMO 2/3/4 ($r = 0,54$; $p = 0,02$), hnRNPA2/B1 ($r = 0,75$; $p = 0,0001$)) и средним артериальным давлением (UBC9 ($r = 0,53$; $p = 0,03$)). На основе полученных данных созданы логистические модели прогнозирования риска развития ранней (UBC9 (AUC = 0,88; Se-0,72; Sp-1)) и поздней ПЭ (SUMO 1 (AUC = 0,79; Se-0,8; Sp-0,77)) на сроке 11–14 недель беременности.

Ключевые слова: экзосомы, сумоилирование, SUMO, прогнозирование, плацентарная дисфункция, преэклампсия

Финансирование: работа выполнена при поддержке гранта РФФИ [22-15-00363 «Эпигенетические и биохимические аспекты патологии беременности при нарушениях инвазивных свойств трофобласта: от ранней диагностики к профилактике материнской и перинатальной заболеваемости»].

Вклад авторов: В. А. Гусар, А. В. Тимофеева — концепция исследования; И. С. Федоров — статистический анализ, графическое оформление; В. А. Гусар, А. М. Тарасова — проведение исследований (вестерн-блоттинг); Ю. В. Сухова, Т. Ю. Иванец — формирование клинической базы, гормональные исследования; В. А. Гусар — анализ/интерпретация данных, подготовка статьи; А. В. Тимофеева — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» Минздрава России (№ 13 от 12 октября 2015 г.); добровольное информированное согласие получено от всех пациентов, включенных в исследование.

✉ **Для корреспонденции:** Владислава Анатольевна Гусар
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; v_gusar@mail.ru

Статья получена: 29.01.2024 **Статья принята к печати:** 20.02.2024 **Опубликована онлайн:** 29.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.010

EMERGING PREDICTION OF PREECLAMPSIA BASED ON THE EXPRESSION OF EXOSOMAL SUMO PROTEINS

Gusar VA [✉], Timofeeva AV, Fedorov IS, Tarasova AM, Sukhova YuV, Ivanets TYu

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

The cellular response to various types of stress underlying placental vascular dysfunction is under the sumoylation control. Consequently, SUMO homeostasis is closely related to the maintenance of angiogenic balance, the disruption of which is a feature of preeclampsia (PE). The goal of the research is to search for exosomal markers of such a disorder. The expression and prognostic potential of exosomal SUMO 1–4, UBC9 and hnRNPA2/B1 were evaluated in 39 pregnant women (cohort I) in the first trimester using Western blotting technology. The expression of these proteins in the placenta (cohort II, 27 pregnant women) at the time of delivery was also assessed. The expression of their conjugated forms was significantly changed in pregnant women with early-onset (SUMO 1, $p = 0.03$; SUMO 2/3/4, $p = 0.03$) and late-onset PE (SUMO 1, $p = 0.03$; SUMO 2/3/4, $p = 0.04$; UBC9 and hnRNPA2/B1, $p < 0.0001$, respectively). This change may be due to the functional specificity of SUMO isoforms in the context of their subcellular targets upon exposure to stressful stimuli. Significant changes in the expression of these proteins were also found in the placenta. Significant correlations were established between the expression of exosomal SUMO 2/3/4 ($r = -0.59$; $p = 0.01$) and UBC9 ($r = -0.88$; $p = 0.0001$) with PIGF in early-onset PE. In late-onset PE, hnRNPA2/B1 ($r = -0.48$; $p = 0.03$) and UBC9 ($r = -0.48$; $p = 0.03$) was correlated with β -hCG, and SUMO 2/3/4 with PAPP-A ($r = -0.60$; $p = 0.006$) in the blood serum of pregnant women. The analyzed proteins also significantly correlated with uterine artery pulsation index (SUMO 1 ($r = 0.59$; $p = 0.01$), SUMO 2/3/4 ($r = 0.54$; $p = 0.02$), hnRNPA2/B1 ($r = 0.75$; $p = 0.0001$)) and mean arterial pressure (UBC9 ($r = 0.53$; $p = 0.03$)). Based on the data the logistic models have been created to predict the risk of developing early-onset (UBC9 (AUC = 0.88; Se-0.72; Sp-1)) and late-onset PE (SUMO 1 (AUC = 0.79; Se-0.8; Sp-0.77)) at 11–14 weeks of pregnancy.

Keywords: exosomes, sumoylation, SUMO, prediction, placental dysfunction, preeclampsia

Funding: the study was supported by the RSF grant [22-15-00363 “Epigenetic and biochemical aspects of abnormal pregnancy in disturbances of the trophoblast invasive properties: from early diagnosis to prevention of maternal and perinatal morbidity”].

Author contribution: Gusar VA, Timofeeva AV — study concept; Fedorov IS — statistical analysis, graphic design; Gusar VA, Tarasova AM — research procedure (western blotting); Sukhova YuV, Ivanets TYu — providing the clinical basis, assessment of hormones; Gusar VA — data analysis/interpretation, manuscript writing; Timofeeva AV — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 13 dated 12 October 2015); the informed consent was obtained from all the patients enrolled.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladoslava A. Gusar
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; v_gusar@mail.ru

Received: 29.01.2024 **Accepted:** 20.02.2024 **Published online:** 29.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.010

Многочисленными исследованиями доказана роль плацентарной дисфункции в основе неблагоприятных исходов беременности, среди которых преэклампсия (ПЭ) и задержка роста плода (ЗРП). Молекулярная составляющая данных синдромов представлена ключевыми процессами, объединенными стрессом — гипоксическим, окислительным/нитратным, митохондриальным и эндоплазматического ретикулума [1–4], который возникает в результате аномальной эндovasкулярной инвазии спиральных артерий трофобластом. Вследствие этого в кровотоке матери выделяются различные факторы, нарушающие ангиогенный баланс [5]. Происходящие

при этом патологические изменения приводят к более высокому риску метаболических, сердечно-сосудистых и нефрологических заболеваний у женщин и их плодов в отдаленном периоде [6, 7].

В целом, ПЭ определяют как мультисистемное заболевание, с впервые возникшей артериальной гипертензией, сопровождающейся значительной протеинурией (или без нее) после 20 недель беременности [8, 9]. За прошедшие три десятилетия это определение было расширено по времени появления симптомов на ранних или поздних сроках беременности, с родоразрешением до или после 34 недель, а также различных фенотипов,

Таблица 1. Клинические характеристики беременных (когорта I)

	11–14 недель беременности						
	Беременные с ранней ПЭ (n = 11)	Беременные с поздней ПЭ (n = 10)	Беременные с высоким риском развития ПЭ (n = 9)	Физиологическая беременность (n = 9)	p (рПЭ vs.ФБ)	p (пПЭ vs.ФБ)	p (высокий риск vs.ФБ)
Гестационный срок на момент скрининга, недели	12,1 (11,8; 12,25)	12,15 (12,1; 12,47)	12,1 (11,6; 12,3)	12,35 (12,03; 12,9)	0,1	0,3	0,3
ПЭ в анамнезе, n (%)	0	0	0	0	–	–	–
Среднее артериальное давление, МоМ	1,06 (1; 1,11)	0,98 (0,94; 1,1)	0,96 (0,95; 0,98)	1 (0,96; 1,04)	0,08	1	0,07
PIGF (17,6–70,0, пкг/мл; 12 недель гестации)	11,7 (6,3; 18,0)	15,8 (15,6; 23,08)	18,8 (18,8; 18,8)	18,05 (16,01; 26,5)	0,001	0,2	0,8
β-hCG (0,5–2,0, МоМ)	0,92 (0,65; 1,07)	0,72 (0,52; 0,8)	0,74 (0,58; 1,22)	1,38 (1,18; 1,8)	<0,001	<0,001	0,07
PAPP-A (0,5–2,0, МоМ)	0,9 (0,72; 1,1)	0,65 (0,57; 1,17)	1,07 (0,9; 1,32)	0,87 (0,74; 1,28)	0,7	0,3	0,5
УЗИ:							
КТР (43–84 мм)	57,7 (56,5; 60,2)	58,6 (57,7; 62,5)	57,6 (56; 61,2)	64,4 (55,7; 66,0)	0,11	0,3	0,4
ТВП (1,6–1,7 мм)	1,6 (1,38; 1,73)	1,5 (1,42; 1,85)	1,5 (1,29; 1,9)	1,25 (1,2; 1,6)	0,2	0,1	0,6
ПИ МА (0,76–1,1, МоМ)	1,14 (1; 1,21)	0,99 (0,76; 1,3)	1,1 (1,02; 1,19)	1,02 (0,91; 1,13)	0,3	0,7	0,3
ПИ ВП	0,98 (0,98; 0,98)	0,97 (0,97; 0,97)	0,95 (0,95; 0,95)	1,06 (0,99; 1,14)	0,02	0,02	0,03
	Клинические характеристики на момент родов						
Гестационный срок на момент родов, недели	32,1 (30,7; 33,35)	37,2 (36,47; 38,27)	38,3 (37,6; 39,2)	38,8 (38,35; 39,35)	<0,001	0,01	0,4
Систолическое артериальное давление (110–130 мм рт. ст.)	150 (145; 160)	140 (130; 150)	140 (115; 147)	115 (110; 131,2)	<0,001	0,006	0,08
Диастолическое артериальное давление (65–80 мм рт. ст.)	100 (90; 100)	90 (90; 95)	90 (75; 90)	77,5 (71,2; 85,2)	<0,001	0,003	0,1
Протеинурия (0–0,2 г/л)	1,98 (1,08; 2,5)	0,27 (0,13; 0,95)	0,09 (0; 0,1)	0 (0; 0,1)	<0,001	0,01	0,5
Периферические отеки, n (%)	5 (45,4)	4 (40,0)	1 (11,1)	3 (33,3)	–	–	–
Соотношение маркеров плацентарной дисфункции (sFLT-1/PIGF; 1,5–7)	316,6 (116,7; 433,9)	120,1 (78,8; 156,9)	133,7 (117,9; 173,4)	54,4 (54,4; 54,4)	0,01	<0,001	<0,001
Тромбоциты (150–400 × 10 ⁹ кл./л)	220 (146; 233)	244 (142; 262,5)	212 (186; 234)	247,5 (235,7; 270,2)	0,03	0,07	0,07
АЛТ (0–40 Ед/л)	30,9 (21,7; 68,05)	20,6 (15,4; 22,3)	19,2 (18,1; 26,1)	31,8 (18,2; 31,8)	0,09	1	0,7
АСТ (0–40 Ед/л)	27,3 (21,7; 43,15)	25,1 (20,05; 32,6)	17,4 (16,3; 34,5)	19,7 (19,7; 20,6)	0,08	0,3	0,8
УЗИ ПИ МА (среднее значение)	1,24 (1,05; 1,38)	0,9 (0,74; 0,99)	0,68 (0,55; 0,85)	0,57 (0,52; 0,6)	<0,001	0,001	0,1
Вес при рождении, граммы	1350 (1195; 1572)	2721 (2409,25; 2992,5)	3040 (2750; 3266)	3320 (3257; 3612,5)	<0,001	0,01	0,05
Апгар 1	7 (7; 7)	8 (8; 8)	8 (8; 8)	8 (8; 8)	<0,001	1	0,2
Апгар 5	8 (7; 8)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	9 (9; 9)	<0,001	0,3	0,8
Неонатальные исходы:							
ВП, n (%)	7 (63,6)	0	0	0	–	–	–
ВЖК, n (%)	5 (45,4)	0	0	0	–	–	–
РДС, n (%)	2 (18,1)	0	0	0	–	–	–

Примечание: рПЭ — ранняя преэклампсия; пПЭ — поздняя преэклампсия; ФБ — физиологическая беременность; PIGF — плацентарный фактор роста; sFLT-1 — растворимая Fms-подобная тирозин киназа 1; PAPP-A — белок А, ассоциированный с беременностью; β-hCG — человеческий хорионический гонадотропин, субъединица β; КТР — копчико-теменной размер; ТВП — толщина воротникового пространства; ПИ МА — пульсационный индекс маточной артерии; ПИ ВП — пульсационный индекс венозного протока; ВП — внутриутробная пневмония; ВЖК — внутрижелудочковое кровоизлияние; РДС — респираторный дистресс-синдром; Медиана (Me) и квартили Q₁, Q₃ в формате Me (Q₁–Q₃) были использованы в случае ненормального распределения.

Таблица 2. Клинические характеристики беременных (когорта II)

	Беременные с рПЭ (n = 7)	Контрольная группа (n = 7)	p	Беременные с пПЭ (n = 7)	Контрольная группа (n = 6)	p
Гестационный срок на момент родов, недели	29 (27; 30)	30 (26,7; 30,5)	0,5	37 (36; 37,5)	38 (38; 38,75)	0,03
Манифестация ПЭ, недели	25 (23,5; 25)	отсутствует	–	36 (36; 36)	отсутствует	–
Систолическое артериальное давление (110–130 мм рт. ст.)	150 (145; 170)	115 (109,2; 117,5)	0,002	140 (140; 147,5)	110 (110; 113,7)	0,03
Диастолическое артериальное давление (65–80 мм рт. ст.)	100 (92,5; 106,5)	70 (67,5; 72,9)	0,002	100 (90; 100)	70 (70; 70)	0,005
Протеинурия (0–0,2 г/л)	2,08 (0,82; 3,72)	отсутствует	–	1,07 (0,39; 1,81)	отсутствует	–
Периферические отеки, n (%)	1 (14,2)	отсутствует	–	5 (71,4)	отсутствует	–
Соотношение маркеров плацентарной дисфункции (sFLT-1/PLGF; 1,5–7)	413 (315,65; 546,43)	НА	–	219,79 (80,9; 289,9)	НА	–
Тромбоциты (150–400 × 10 ⁹ кл./л)	129 (102,5; 185)	246 (190,5; 269)	0,01	233 (219; 254,5)	233,5 (192; 287,7)	1
АЛТ (0–40 Ед/л)	64,3 (22,15; 91,22)	НА	–	22,6 (20; 28,65)	НА	–
АСТ (0–40 Ед/л)	37,4 (24; 48,37)	НА	–	28,3 (22,6; 32,95)	НА	–
Вес при рождении, г	826,17 (590; 1068,5)	ОНМТ	–	2725 (2495; 2774,5)	3325 (2892,5; 3401,2)	0,1

Примечание: рПЭ — ранняя преэклампсия; пПЭ — поздняя преэклампсия; НА — не анализировали; ОНМТ — очень низкая масса тела при рождении; Медиана (Me) и квартили Q₁, Q₃ в формате Me (Q₁–Q₃) были использованы в случае ненормального распределения.

обусловленных неблагоприятным воздействием на плод (ПЭ в сочетании или без ЗРП) [8]. Следует отметить дискуссионные споры, возникающие в последнее время, согласно которым сердечно-сосудистая система матери является этиологической первопричиной ПЭ [5, 10]. Тем не менее, связующим механизмом между плацентарной дисфункцией и сердечно-сосудистой дезадаптацией матери служит ангиогенно-антиангиогенный дисбаланс [10]. При физиологической беременности уровни ангиогенного плацентарного фактора роста (PLGF) и антиангиогенного фактора sFlt-1 (растворимая fms-подобная тирозинкиназа1) сбалансированы, но в условиях гипоксии и окислительного стресса происходит увеличение секреции sFlt-1 цитотрофобластом, что приводит к нарушению ангиогенеза. Предполагается, что есть различные пути, модулирующие экспрессию PLGF [11]. Один из них опосредован транскрипционным фактором GCM-1, играющим критическую роль в поддержании баланса между пролиферацией и дифференцировкой синцитиотрофобласта в I триместре беременности [12] и его вышестоящей мишенью DREAM [13]. Важно подчеркнуть, что модуляция активности последних осуществляется на посттрансляционном уровне, в том числе с помощью сумоилирования [14]. Интересно, что данная модификация также является ключевым игроком в управлении клеточными реакциями на тепловой шок, воспаление и различные виды стресса (окислительный, гипоксический, митохондриальный), лежащего в основе плацентарной дисфункции [15–18].

Сумоилирование — динамичный обратимый процесс, осуществляемый белками SUMO (от англ. small ubiquitin-like modifier), имеющими четыре изоформы, а их конъюгацию (образование изопептидной связи между SUMO и целевым белком) осуществляет фермент UBC9 [19]. Сумоилирование привлекает все больше внимания в контексте регуляции экспрессии молекул, опосредующих функцию плаценты и ангиогенез. Однако количество данных по изучению сумоилирования при плацентарных заболеваниях ограничено. Так, опубликованы результаты исследования о значимом повышении уровня SUMO 1 и SUMO 2/3 в

плаценте при тяжелой ранней ПЭ [20]. А эволюционный подход WGCNA идентифицировал модули коэкспрессии генов, играющих решающую роль в патогенезе ПЭ, среди которых SUMO 1 и гетерогенный ядерный белок hnRNP, участвующий в связывании с микроРНК (мкРНК), в качестве кандидатных генов положительного отбора [21].

Скоординированный интерфейс между фетоплацентарной и материнской системой представляет собой сложный многомерный массив тканей, резидентных и циркулирующих факторов, охватывающий развивающийся плод, плаценту, децидуа и динамичную сердечно-сосудистую систему матери [1]. Он осуществляется посредством внеклеточных везикул (экзосомы, микровезикулы, апоптотические пузырьки), которые секретируются различными типами клеток, несут определенный груз (белки, липиды, транскрипты мРНК), а также имеют способность модулировать функцию клеток-мишеней и обладают терапевтическим потенциалом [22, 23]. В частности, экзосомы избирательно упакованы сигнальными молекулами, такими как мкРНК и белки. Их секреция синцитиотрофобластом увеличивается при плацентарной дисфункции [24–26]. И что наиболее примечательно, избирательность и загрузка мкРНК в экзосомы осуществляются посредством сумоилирования гетерогенного ядерного белка hnRNP2/B1 [27].

Прогресс в понимании молекулярных процессов, объединяющих плацентарную дисфункцию и сердечно-сосудистую систему матери, указывает на то, что нарушения ангиогенно-антиангиогенного баланса могут являться целью для поиска экзосомных прогностических маркеров. В наших предыдущих исследованиях было продемонстрировано наличие регуляторного механизма по оси miR-652-3p / SUMO 2/3/4 / UBC9 / GCM-1 / PIGF в ткани плаценты беременных с ранней ПЭ [28] и изменение экспрессии SUMO 1–4 и UBC9 в экзосомах беременных с ранней ПЭ на момент родов [29]. В продолжение данных исследований мы сфокусировали свое внимание на оценке экспрессии экзосомных белков SUMO 1–4, UBC9, а также hnRNP2/B1 в качестве предикторов плацентарной дисфункции на ранних гестационных сроках (11–14 недель) до проявления клинических признаков данной патологии.

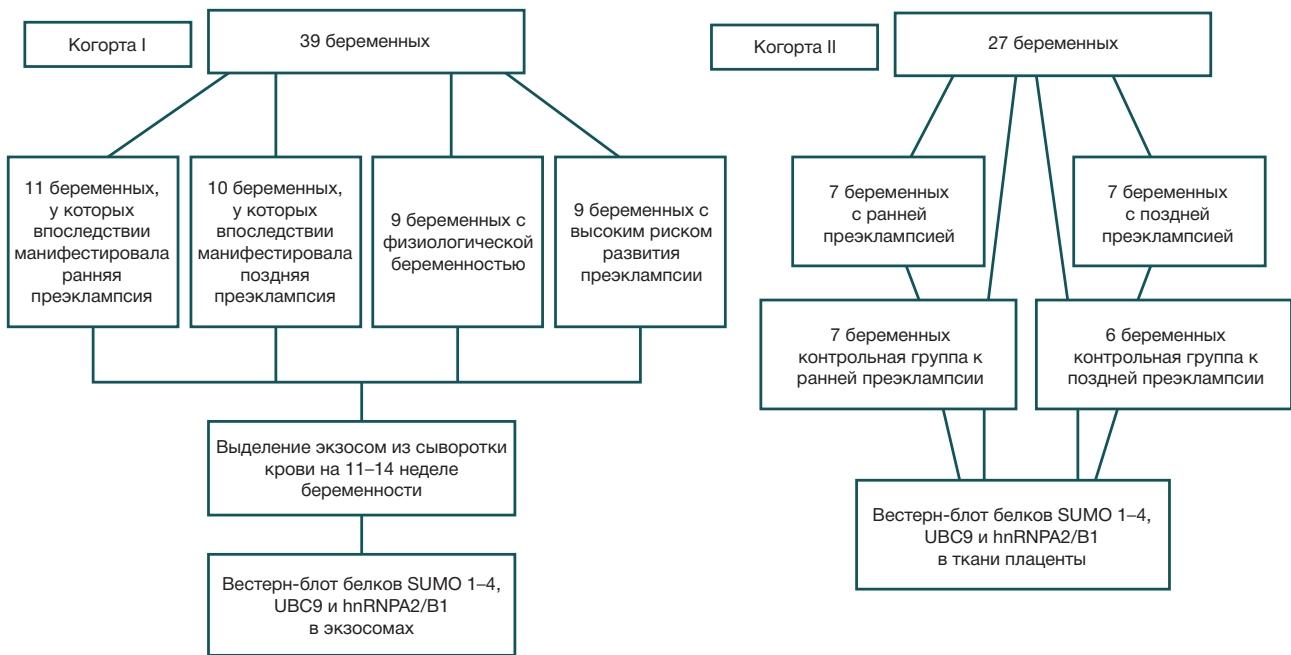


Рис. 1. Блок-схема дизайна исследования

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования и когорты пациентов

В данное исследование включены беременные женщины, которые находились под наблюдением в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Минздрава Российской Федерации. Общая выборка пациенток репродуктивного возраста составила 66 беременных, разделенных на две когорты (рис. 1). Критерии включения: одноплодная беременность; возраст пациенток 25–40 лет; родоразрешение естественным путем и с помощью операции кесарево сечение. Критерии исключения: в обе когорты не включали беременных с многоплодной беременностью, возникшей в результате вспомогательных репродуктивных технологий, отягощенным соматическим анамнезом и наличием генетических патологий у матери и плода. Когорта I включала 39 беременных и была разделена на группы: беременные, у которых в последующем манифестировала ранняя ПЭ (11 беременных) и поздняя ПЭ (10 беременных); беременные с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга I триместра и благоприятным исходом беременности (9 беременных); беременные с физиологическим течением беременности (9 беременных). Экспрессию белков SUMO, UBC9 и hnRNP A2/B1 оценивали в экзосомах беременных на сроке 11–14 недель гестации. В когорту II включили 27 беременных с ранней ПЭ (7 беременных), поздней ПЭ (7 беременных) и контрольную группу соответствующего срока (7 и 6 беременных соответственно) для оценки экспрессии белков в образцах плацент. Клинические характеристики беременных представлены в табл. 1 и 2.

Выделение экзосом из сыворотки крови беременных

Образцы цельной крови брали у беременных на сроке 11–14 недель беременности (когорты I). Предварительно их центрифугировали в течение 20 мин (+4 °C, 300 g). Затем

верхнюю фазу аккуратно переносили в чистую пробирку с коническим дном и повторно центрифугировали в течение 10 мин (+4 °C, 16 000 g) для удаления клеточного дебриса. Из приготовленных образцов в количестве 600 мкл использовали для очистки экзосом с помощью miRCURY Exosome Serum/Plasma Kit (кат. № 76603; Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя и последующего проведения вестерн-блоттинга.

Вестерн-блоттинг экзосомных и тканевых белков

Для оценки экспрессии белков использовали плацентарную ткань (поперечный срез материнской и плодной части плаценты толщиной не более 5 мм, полученный сразу после родов) беременных (когорты II). Порошкообразные образцы тканей, предварительно измельченные в жидком азоте, гомогенизировали в буферной системе для лизиса RIPA (sc-24948; Santa Cruz Biotechnology, США). Разделение белков (20 мкг на дорожку геля) проводили в буфере Трис/Трицин/SDS (12,5%). Перенос экзосомных и тканевых белков на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм, кат. № 1620115; Bio-Rad, США) осуществляли с помощью Trans-Blot SD™ (кат. № 170-3957; Bio-Rad, США) в 10 mM CAPS + 10% C₂H₅OH (pH = 11). Мембраны блокировали 5%-м раствором NFDМ/TBST в течение 2 ч при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами SUMO 1 (1:500, sc-5308; Santa Cruz Biotechnology, США), SUMO 2/3/4 (1:500, sc-393144; Santa Cruz Biotechnology, США), UBC9 (1:500, sc-271057; Santa Cruz Biotechnology, США), hnRNP A2/B1 (1:500, sc-374053; Santa Cruz Biotechnology, США) и Actin (1:100, sc-376421; Santa Cruz Biotechnology, США) проводили в течение 2 ч при комнатной температуре. Со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2031; Santa Cruz Biotechnology, США), инкубировали в 1%-м NFDМ/TBST в течение 1 ч при комнатной температуре. В качестве реагента для обнаружения использовали SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate Kit (кат. № 34096; Thermo Scientific™, США). Денситометрический анализ проводили

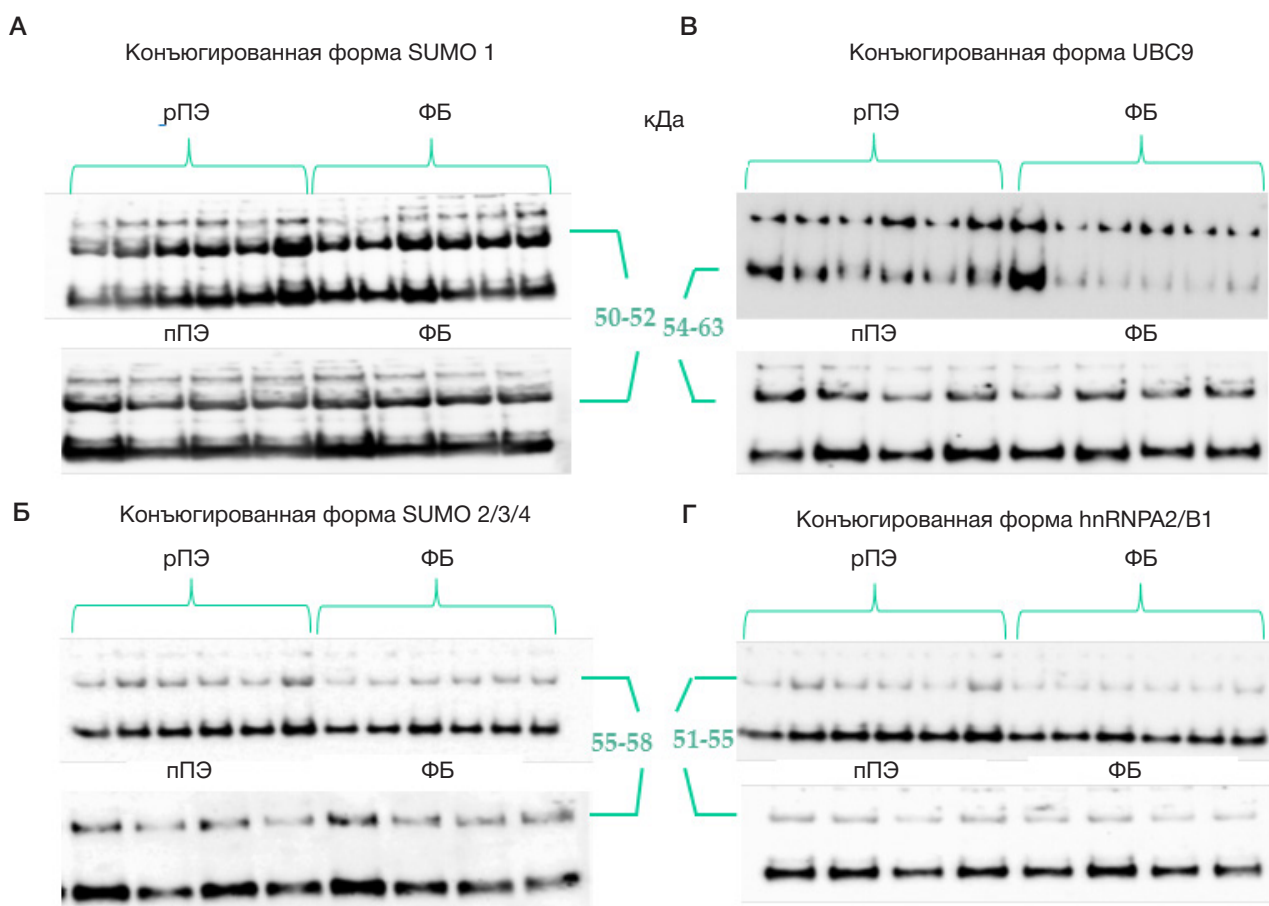


Рис. 2. Вестерн-блот мембран с конъюгированными экзосомными формами SUMO 1 (А), SUMO 2/3/4 (Б), UBC9 (В) и hnRNPA2/B1 (Г) у беременных с манифестировавшей впоследствии ранней преэклампсией (рПЭ), поздней (пПЭ) и физиологически протекающей беременностью (ФБ)

с использованием программного обеспечения Bio-Rad ImageLab 6.0 (Bio-Rad; США). Экспрессию тканевых белков SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP A2/B1 нормировали по отношению к актину, а уровень SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP A2/B1 в экзосомах нормировали на концентрацию общего белка.

Оценка биохимических показателей пренатального скрининга в сыворотке крови беременных женщин

Концентрацию плацентарных факторов (sFlt-1, PLGF) и гормонов (PAPP-A, b-HCG) в сыворотке крови у беременных на сроках 11–14 недель гестации определяли электрохемилюминесцентным методом на автоматическом иммунохимическом анализаторе Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH; Германия) с использованием коммерческих наборов данного производителя.

Статистический анализ данных

Оценку статистической значимости между клиническими показателями и экспрессией белка в исследуемых группах проводили с помощью теста Уилкоксона–Манна–Уитни с использованием скриптов, написанных на языке R (<https://www.R-project.org>). Для оценки связи экспрессии белка с клиническими показателями беременных женщин использовали метод непараметрической ранговой корреляции Спирмена. Модели логистической регрессии экспрессии белков были созданы для проверки возможности их использования в качестве биомаркеров. Эффективность созданных моделей оценивали с помощью ROC-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка экспрессии SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в экзосомах на сроках 11–14 недель беременности

Экспрессия SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в экзосомах, выделенных из плазмы крови беременных на сроках 11–14 недель гестации, с физиологической беременностью, манифестировавшей впоследствии ранней и поздней ПЭ, а также беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга, была оценена методом вестерн-блоттинга. Детектировано несколько конъюгированных форм указанных белков, различающихся по молекулярным массам, при этом свободных форм в экзосомах не обнаружено (рис. 2А–Г).

Сравнительный анализ показал, что в экзосомах беременных с ранней ПЭ экспрессия конъюгированной формы SUMO 1 (~50–52 кДа) значимо снижена ($p = 0,03$), а SUMO 2/3/4 (~55–58 кДа) повышена относительно физиологической беременности ($p = 0,03$). Экспрессия примерных по молекулярному весу конъюгированных UBC9 (~54–63 кДа) и hnRNPA2/B1 (~51–55 кДа) также была повышена, но без статистически значимых отличий ($p = 0,07$ и $p = 0,3$ соответственно). Предположительно, указанные формы являются конъюгатом SUMO 1 + UBC9, поскольку молекулярный вес их свободных форм составляет ~12 кДа и ~18 кДа соответственно. А при присоединении hnRNPA2/B1 (свободная форма ~36/38 кДа) как мишени SUMO 1 их суммарный молекулярный вес может составлять ~50–56 кДа.

При поздней ПЭ также наблюдается значимое снижение экспрессии конъюгированной формы SUMO 1 (~50–52 кДа;

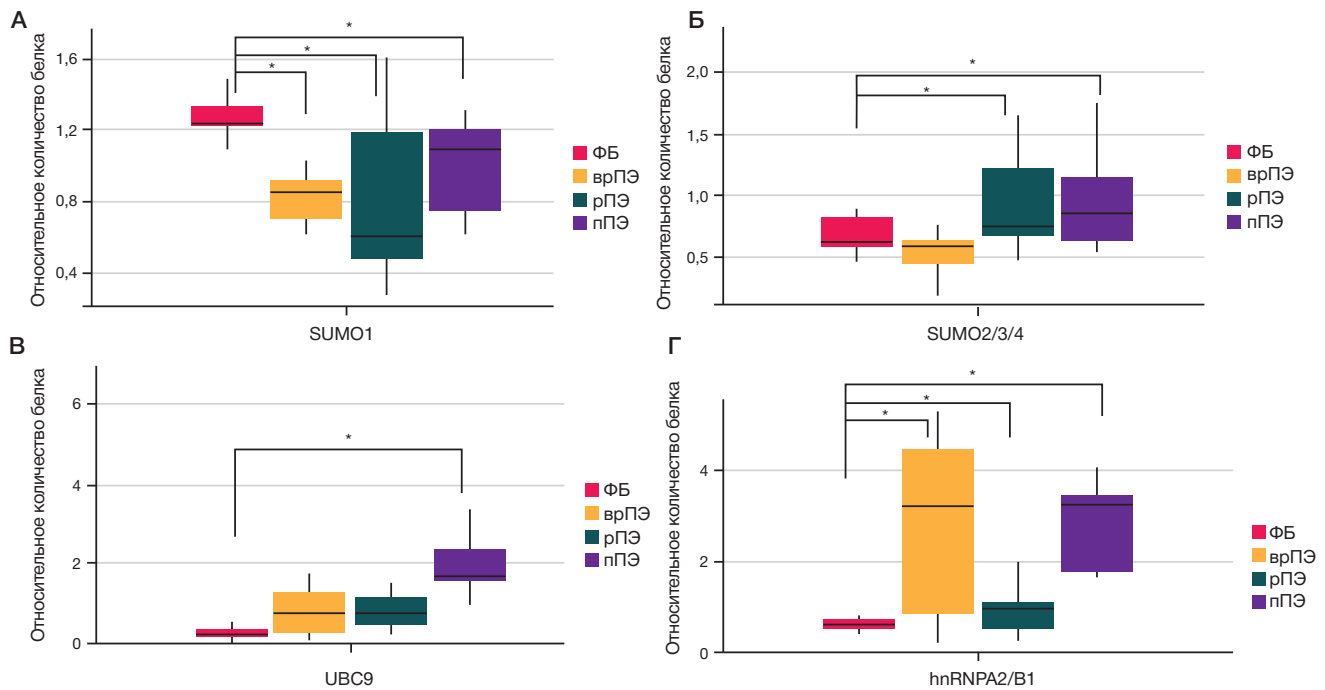


Рис. 3. Сравнительный анализ экспрессии SUMO 1 (А), SUMO 2/3/4 (Б), UBC9 (В) и hnRNPA2/B1 (Г) в экзосомах у беременных с манифестировавшей впоследствии ранней преэклампсией (рПЭ), поздней (пПЭ) и физиологически протекающей беременностью (ФБ). Количественная денситометрия белков, нормированных на контрольный образец. Данные представлены в формате Me (Q₁; Q₃); *: статистически значимый уровень $p \leq 0,05$ в сравнении с ФБ; врПЭ — высокий риск развития ПЭ

$p = 0,03$), при этом экспрессия конъюгированных форм SUMO 2/3/4 (~55–58 кДа; $p = 0,04$), UBC9 (~54–63 кДа; $p < 0,0001$) и hnRNPA2/B1 (~51–55 кДа; $p < 0,0001$) значительно повышена относительно физиологической беременности (рис. 3А–Г).

Интересно, что при анализе экспрессии исследуемых белков в группе беременных с высоким риском развития ПЭ также выявлено значимое снижение экспрессии конъюгированного SUMO 1 (~50–52 кДа; $p = 0,007$) и повышение экспрессии конъюгированных UBC9

(~54–63 кДа), hnRNPA2/B1 (~51–55 кДа) относительно физиологической беременности ($p = 0,01$ и $p = 0,001$ соответственно).

Оценка экспрессии SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в плаценте при ранней и поздней ПЭ

В связи со значимыми изменениями экспрессии конъюгированных форм SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в экзосомах беременных, секретируемых

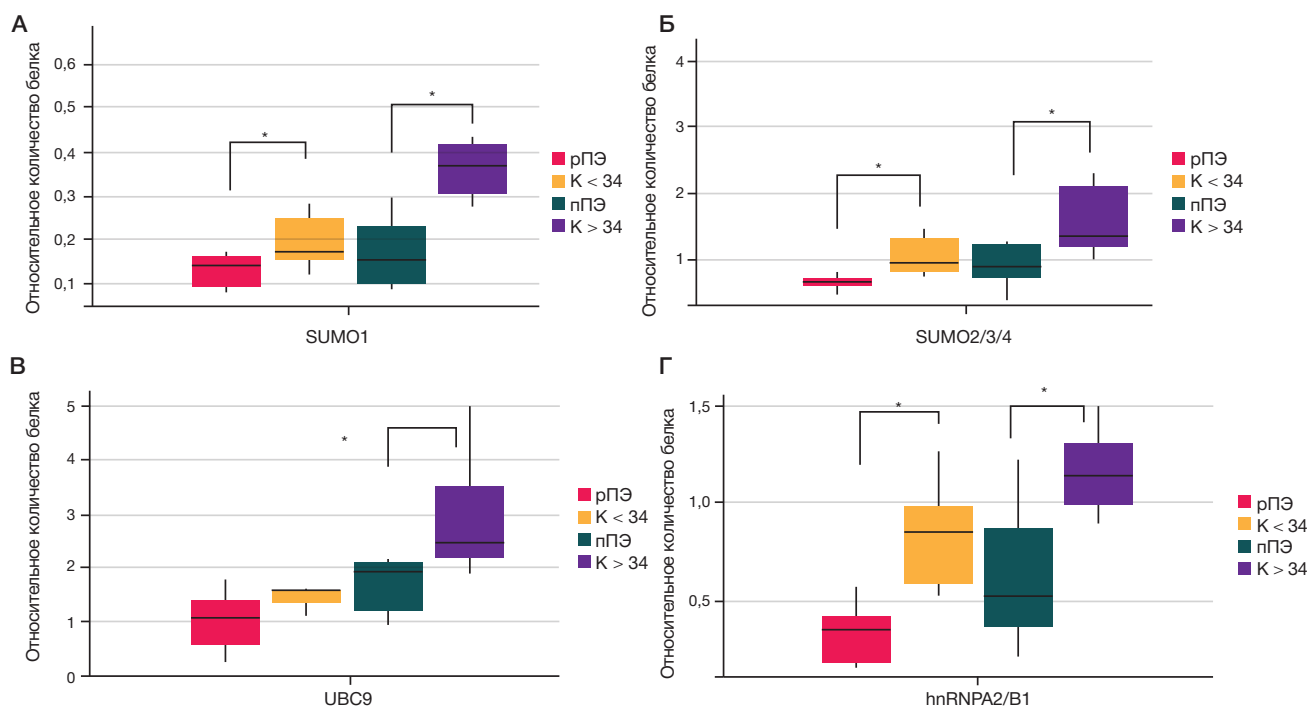


Рис. 4. Сравнительный анализ экспрессии SUMO 1 (А), SUMO 2/3/4 (Б), UBC9 (В) и hnRNPA2/B1 (Г) в ткани плаценты у беременных с ранней преэклампсией (рПЭ) и поздней преэклампсией (пПЭ), и контроля соответствующего срока ($n < 34$, $n > 34$). Количественная денситометрия белков, нормированных на актин. Данные представлены в формате Me (Q₁; Q₃); * — статистически значимый уровень $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем соответствующего срока

Таблица 3. Результаты корреляции экспрессии белков в экзосомах с показателями комбинированного пренатального скрининга беременных с ранней и поздней ПЭ

Параметр	SUMO 1		SUMO 2/3/4		UBC9		hnRNPA2/B1	
	<i>r</i> *	<i>p</i> **	<i>r</i> *	<i>p</i> **	<i>r</i> *	<i>p</i> **	<i>r</i> *	<i>p</i> **
Ранняя ПЭ								
Среднее артериальное давление	нс	нс	нс	нс	0,53	0,03	нс	нс
ПИ МА, МоМ	0,59	0,01	0,54	0,02	нс	нс	0,75	0,0001
PIGF	нс	нс	-0,59	0,01	-0,88	0,0001	нс	нс
Поздняя ПЭ								
β-hCG, МоМ	нс	нс	нс	нс	-0,48	0,03	-0,63	0,004
PAPP-A, МоМ	нс	нс	-0,60	0,006	нс	нс	нс	нс

Примечание: * *r* — коэффициент корреляции Спирмена; ** *p* — статистическая значимость корреляции; Нс — не значимо статистически.

синцитиотрофобластом на сроках 11–14 недель гестации, была оценена их экспрессия в плаценте у беременных с ранней и поздней ПЭ. Методом вестерн-блоттинга идентифицированы различающиеся по молекулярным массам конъюгированные фрагменты указанных белков, соответствующие выявленным таковым в экзосомах.

Сравнительный анализ позволил выявить в плаценте значимое снижение экспрессии конъюгированных форм SUMO 1 (~50–55 кДа, *p* = 0,04; *p* = 0,04 соответственно), SUMO 2/3/4 (~55–59 кДа; *p* = 0,008, *p* = 0,05 соответственно) и hnRNPA2/B1 (~54 кДа; *p* = 0,01, *p* = 0,009 соответственно) при ранней и поздней ПЭ, которые примерно соответствуют молекулярным весам фрагментов, детектированных в экзосомах. При этом экспрессия конъюгированного UBC9 (~53–55 кДа; *p* = 0,04) значимо снижена только при поздней ПЭ относительно группы сравнения соответствующего срока гестации (рис. 4А–Г).

Оценка взаимосвязи экспрессии экзосомных SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 с клиническими показателями комбинированного пренатального скрининга I триместра в группах беременных. Прогностическая значимость

Учитывая значимое изменение экспрессии исследуемых белков в экзосомах, мы оценили взаимосвязь данных изменений с показателями комбинированного пренатального скрининга I триместра в группах

беременных с манифестацией ранней и поздней форм ПЭ с использованием метода непараметрической ранговой корреляции Спирмена (табл. 3).

В сыворотке крови беременных с ранней ПЭ уровни экзосомных SUMO 1 (*r* = 0,59; *p* = 0,01), SUMO 2/3/4 (*r* = 0,54; *p* = 0,02) и hnRNPA2/B1 (*r* = 0,75; *p* = 0,0001) значимо коррелировали с пульсационным индексом маточной артерии, а уровень UBC9 — со средним артериальным давлением (*r* = 0,53; *p* = 0,03). При этом наблюдали высокую обратную корреляцию уровня SUMO 2/3/4 (*r* = -0,59; *p* = 0,01) и UBC9 (*r* = -0,88; *p* = 0,0001) с концентрацией PIGF. Интересно, что у беременных с поздней ПЭ была установлена взаимосвязь с биохимическими показателями комбинированного скрининга: концентрации b-hCG с уровнем экзосомных UBC9 (*r* = -0,48; *p* = 0,03) и hnRNPA2/B1 (*r* = -0,48; *p* = 0,03), а также концентрации PAPP-A с уровнем SUMO 2/3/4 (*r* = -0,60; *p* = 0,006).

С целью оценки возможности использования экзосомных SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1 в качестве потенциальных предикторов развития ПЭ на ранних сроках беременности были разработаны модели логистической регрессии (рис. 5А–Г; табл. 4). ROC-кривые для логистических моделей представлены различными комбинациями, среди которых были выбраны значимые (формулы для них представлены в табл. 4). Особенно важно, что выбранные модели позволяют также дифференцировать беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга I триместра от беременных с ПЭ и беременных с физиологически протекающей беременностью.

Таблица 4. Прогностические значения с параметрами логистических моделей для SUMO 1–4, UBC9 и hnRNPA2/B1

	AUC	Чувствительность	Специфичность	Cutoff	<i>p</i>	Параметры	Формулы
рПЭ vs. ФБ							
UBC9	0,88	0,72	1	0,72	0,03	<i>i</i> — 2,65 UBC9 — 6,73	$\frac{1}{1+e^{2,65-6,73x_1}}$
пПЭ vs. ФБ							
SUMO 1	0,79	0,8	0,77	0,43	0,05	<i>i</i> — 7,4 SUMO1 — 6,29	$\frac{1}{1+e^{7,4-6,29x_1}}$
врПЭ vs. ПЭ							
UBC9; hnRNPA2/B1	0,94	0,80	1	0,79	0,02/0,01	<i>i</i> — 0,18 UBC9 — 6,23 hnRNPA2/B1 — 2,19	$\frac{1}{1+e^{-0,18-6,23x_1+2,19x_2}}$
врПЭ vs. ФБ							
SUMO 1	0,91	0,88	1	0,58	0,02	<i>i</i> — 9,78 SUMO1 — 9,073	$\frac{1}{1+e^{-9,78+9,073x_1}}$

Примечание: рПЭ — ранняя преэклампсия; пПЭ — поздняя преэклампсия; врПЭ — высокий риск развития преэклампсии; ФБ — физиологическая беременность; AUC — площадь под кривой.

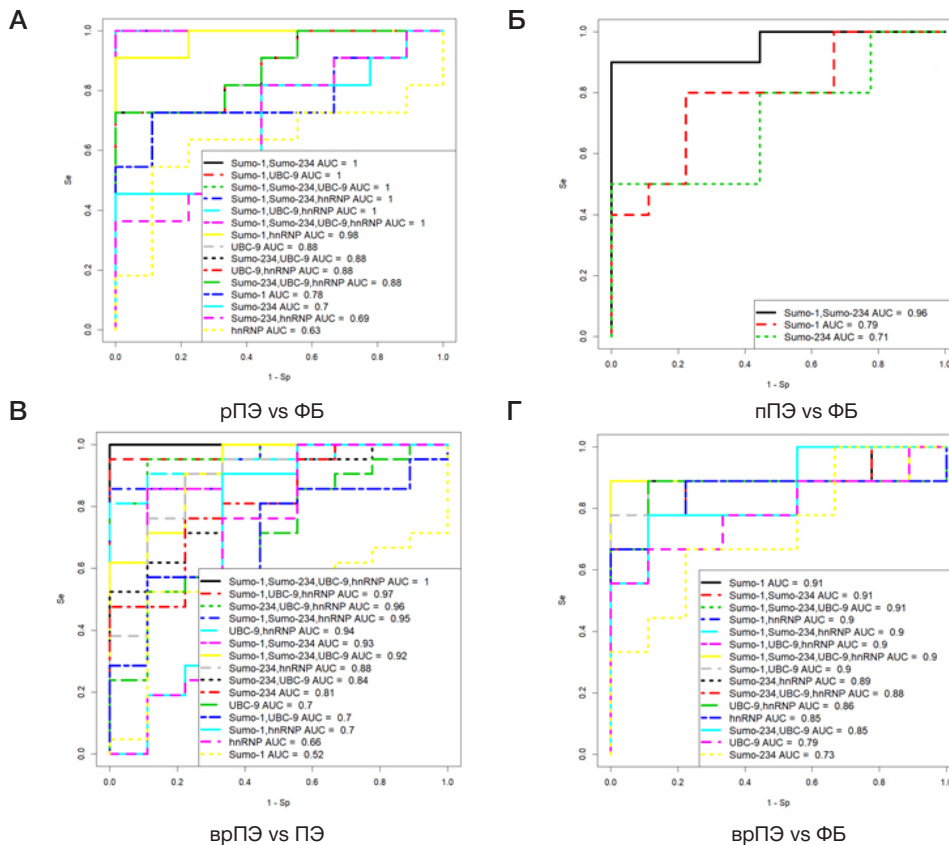


Рис. 5. ROC-кривые для логистических моделей оценки риска развития ПЭ на основе определения экспрессии SUMO 1–4, UBC9 и hnRNP2/B1 в экзосомах (А–Г) на ранних сроках беременности. рПЭ — ранняя ПЭ. пПЭ — поздняя ПЭ. врПЭ — высокий риск развития ПЭ. ФБ — физиологическая беременность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В основе развития успешной беременности лежит механизм коммуникации между фетоплацентарным и материнским компартаментами, осуществляемый посредством высвобождения биоактивных молекул и внеклеточных везикул, которые отражают патофизиологическое состояние клеток-доноров и могут модулировать функцию клеток-мишеней [30]. Известно, что экзосомы плацентарного происхождения опосредуют адаптацию сосудов матери к беременности, а их концентрация в плазме увеличивается по мере прогрессирования беременности и коррелирует с кровотоком в маточных артериях [31]. Такая функциональная уникальность позволяет их рассматривать в качестве динамичных биомаркеров, осуществляющих мониторинг плацентарной дисфункции в режиме «реального времени» [32].

Интересным аспектом, обращающим на себя внимание, является экзосомный контент, который обуславливает биоактивность экзосом, а его загрузка находится под контролем одной из посттрансляционных модификаций — сумоилирования [27]. Обратимая конъюгация небольшого пептида SUMO с белками-мишенями имеет решающее значение для функции клеток и различных клеточных процессов, включая транскрипцию, репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, ремоделирование хроматина, транспорт нуклеоплазмы, апоптоз [33]. Экспрессия изоформ SUMO 2 и SUMO 3, идентичных друг другу на 97%, а SUMO 1 на 46%, обнаружена во всех эукариотических клетках [19, 34]. Недавно продемонстрировано, что в плаценте экспрессируется еще одна изоформа — SUMO 4 [35]. При этом нарушения гомеостаза сумоилирования связаны с различными патологическими состояниями [36, 37].

Несмотря на имеющиеся данные о вовлеченности сумоилирования в плацентарную дисфункцию [13, 20], информации об экспрессии экзосомных белков SUMO при данной патологии нет.

В контексте вышесказанного мы оценили экспрессию белков SUMO в экзосомах беременных на сроке 11–14 недель гестации (когорта I). Следует отметить, что ранее нами было показано повышение экспрессии конъюгированных форм SUMO 1–4 и UBC9 в экзосомах беременных с ранней ПЭ на момент родов [29] и свободных форм SUMO 1–4, UBC9 в плаценте при ранней ПЭ [28]. В настоящем исследовании экспрессия конъюгированной формы SUMO 1 в экзосомах беременных с ранней ПЭ на сроке 11–14 недель гестации была значимо снижена, в то время как экспрессия SUMO 2/3/4 повышена относительно физиологически протекающей беременности. У беременных с поздней ПЭ выявлена аналогичная картина по направленности экспрессии конъюгированных форм SUMO 1 и SUMO 2/3/4 в экзосомах. Как показано ранее, характер экспрессии белков SUMO может быть обусловлен их уникальным пространственно-временным распределением в слоях трофобласта на протяжении беременности, а также активностью в ответ на окислительный стресс и воспаление. В частности, свободные формы SUMO 1 и SUMO 4 экспрессируются преимущественно в цитотрофобластах в I и II триместрах беременности со смещением в синцитиотрофобласт в III триместре. SUMO 2/3 демонстрирует стабильную экспрессию по всему слою трофобласта в течение беременности. Однако в ответ на гипоксический/окислительный стресс наблюдаются активность и перераспределение SUMO 1 и SUMO 4 в синцитий из цитотрофобласта, а экспрессия SUMO

2/3 увеличивается при воспалительном стрессе [38]. Примечательно, что результаты нашего исследования, в целом, согласуются с приведенными выше данными, демонстрируя разнонаправленную активацию экспрессии экзосомных конъюгированных белков SUMO 1 и SUMO 2/3/4 в ответ на клеточный стресс при плацентарной дисфункции. Тем не менее, под воздействием различных стрессовых стимулов в клетках должна увеличиваться экспрессия всех изоформ SUMO, и их последующая секреция соответственно. Однако в нашем исследовании экспрессия SUMO 1 в экзосомах была снижена, как при ранней, так и при поздней ПЭ. Ранее были обнаружены уменьшение пула свободной формы SUMO 2/3 в клетках и накопление его высокомолекулярных конъюгатов в ответ на клеточный стресс, в отличие от SUMO 1 [39]. Принимая во внимание эти данные, мы выдвинули предположение, что гипоксический и окислительный стресс, возникающий при плацентарной дисфункции на ранних сроках, активирует свободную форму SUMO 2/3 для формирования большого количества конъюгатов с белками-мишенями и индукции стресс-чувствительных сигнальных каскадов посредством экзосом, в то время как SUMO 1 способен избирательно конъюгироваться в ответ на стресс, о чем свидетельствует снижение экспрессии его конъюгированной формы в экзосомах. Интересно, что свободных форм указанных белков в экзосомах мы не обнаружили, а молекулярный вес конъюгированных форм, предположительно, соответствовал суммарному весу их свободной формы с UBC9. Кроме того, экспрессия самого конъюгированного UBC9 также была значимо повышена только при поздней ПЭ относительно физиологической беременности. Следует отметить, что UBC9 является единственным ферментом, который осуществляет конъюгацию изоформ SUMO 1–4 с белками-мишенями, в отличие от системы убиквитинирования [19]. Следовательно, уровень его экспрессии имеет решающее значение для сумоилирования. Основываясь на ранее продемонстрированном пространственно-временном распределении SUMO 1–4 в клетках трофобласта [38], мы предположили, что имеется определенная специфичность конъюгирования UBC9 с SUMO 1 и SUMO 2/3 в контексте их субклеточных мишеней. Тем более, что на модельных объектах уже получены доказательства его различной иммунореактивности с SUMO-белками в зависимости от популяции клеток [40].

Известно, что сумоилирование модулирует транскрипционную активность и локализацию множества ядерных [41] и цитоплазматических белков [42], регулируя, таким образом, широкий спектр биологических процессов. И безусловный интерес представляет недавнее открытие процесса сумоилирования членов семейства гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNPs), который обеспечивает универсальный механизм регуляции их РНК-связывающей активности и последующей селективной сортировки транскриптов в экзосомы [27, 43]. Сумоилирование hnRNPA2/B1 с помощью SUMO 1 является необходимым условием для его связывания со специфичными экзомотивами мкРНК и осуществления их последующей загрузки в экзосомы, тогда как ингибирование сумоилирования может нарушить связывание белка с мкРНК. В нашем предыдущем исследовании были идентифицированы экзомотивы ряда мкРНК, чувствительных к гипоксии, а также установлены корреляции их экспрессии с уровнем SUMO 2/3/4 в плаценте беременных с ранней ПЭ [29].

Опираясь на данную связь, мы оценили экспрессию hnRNPA2/B1, которая, как и в случае с UBC9, была значимо повышена в экзосомах беременных с поздней формой ПЭ на сроке 11–14 недель. Поскольку hnRNPA2/B1 является субстратом SUMO [44], вполне вероятно, что регуляцию его экспрессии в экзосомах может также осуществлять SUMO 2/3/4, если уровень SUMO 1 снижен. Более того, учитывая специфичность конъюгирования UBC9, можно предположить, что при поздней форме ПЭ экспрессия hnRNPA2/B1 активируется посредством конъюгации с UBC9. И это необходимо для загрузки в экзосомы мкРНК, регулирующих ассоциированные с сосудистой дисфункцией мишени. Стоит отметить не менее интересные результаты по экспрессии белков у беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного пренатального скрининга I триместра. Несмотря на наличие маркеров плацентарной дисфункции, исход их беременностей был благополучный. Однако направленность экспрессии конъюгированной формы SUMO 1, UBC9 и hnRNPA2/B1 совпала с таковой при ранней и поздней ПЭ, за исключением SUMO 2/3/4, уровень которого не изменялся.

В связи с установленными изменениями экспрессии конъюгированных форм белков в экзосомах беременных с ПЭ на сроках 11–14 недель гестации представилось интересным оценить их экспрессию в ткани плаценты беременных с ранней и поздней ПЭ (когорты II). Мы обнаружили снижение экспрессии конъюгированных форм SUMO 1–4 и hnRNPA2/B1 в плаценте как при ранней, так и при поздней ПЭ, а уровень UBC9 был значимо снижен только при поздней ПЭ. Результаты оказались и неожиданными, и интригующими. Как было ранее отмечено, процесс сумоилирования, являясь критическим регулятором ответа на клеточный стресс, обуславливает увеличение уровня высокомолекулярных конъюгатов SUMO, равно как и свободных форм. Более того, в предыдущем исследовании выявлено повышение свободных форм SUMO при ранней ПЭ [28]. Такую разнонаправленную экспрессию свободных и конъюгированных форм исследуемых белков в плаценте можно объяснить тем, что свободные формы экспрессируются исключительно в ответ на стрессовые стимулы, выполняя адаптационную функцию, в то время как формирование конъюгатов SUMO необходимо для запуска регуляторных каскадов. При этом изменение их экспрессии зависит от того, что необходимо в данный момент времени — сумоилирование или десумоилирование белка-мишени. Наше предположение нашло подтверждение в ряде исследований. Так, показано, что на ранних сроках беременности (9–10 недель) уровень свободных форм SUMO увеличивается, и это совпадает с физиологической плацентарной гипоксией. Однако на 10–12-й неделе гестации сверхэкспрессия SUMO 2/3 может ингибировать активность HIF 1A (фактора, индуцируемого гипоксией) и для сохранения стабильности последнего десумоилирующий белок SENP 3 снижает экспрессию SUMO 2/3 [45]. Другими авторами приведено доказательство роли десумоилирующего белка SENP 1 в эндотелиальных клетках как положительного регулятора обусловленной гипоксией экспрессии VEGF и ангиогенеза [46, 47]. Что касается плацентарной дисфункции, изменение экспрессии GCM-1, индуцированной гипоксией и регулируемой транскрипционным фактором p45 NF-E2 [48], связано, в том числе, с десумоилированием [49, 50]. Важно отметить, что факторы, повышающие глобальное сумоилирование, не обязательно приводят к изменениям в

сумоилировании всех субстратов SUMO. Сумоилирование отдельных белков осуществляется специфичным для субстрата образом и часто в отсутствие глобальных изменений [51].

Открытие плацентарных факторов способствовало всплеску исследований по их использованию в качестве биомаркеров для диагностики и прогнозирования риска развития ПЭ и ЗРП с 2003 г. [52]. Однако наиболее достоверных результатов удалось достичь в прогнозировании раннего начала ПЭ. Исследователи связывают это с тем, что изменение их уровней является отражением стресса синцитиотрофобласта, т. е. плацентарной дисфункции в целом, а не биомаркером ПЭ [53]. Кроме того, предлагаемый диагностически значимый уровень циркулирующих в крови матери про- и антиангиогенных факторов может быть достигнут в случае проявления патологического состояния, а не на начальном этапе нарушения эндovasкулярной инвазии спиральных артерий трофобластом [54]. В этой связи необходим поиск специфичных маркеров. Интересно, что снижение уровня ангиогенного PLGF и повышение антиангиогенного sFlt-1 в течение III триместра коррелирует с наблюдаемыми изменениями в перераспределении SUMO 1 и SUMO 4 из цитотрофобласта в синцитий, который является единственным типом клеток плаценты, находящимся в непосредственном контакте с материнским кровообращением [38]. А ранее мы обнаружили корреляционную связь между изменениями экспрессии miR-423-3p, miR-652-3p, уровнем SUMO 2/3/4, UBC9 в плаценте и снижением концентрации PLGF в крови беременных с ранней ПЭ на момент родов [28]. Опираясь на данные результаты, мы осуществили поиск корреляций с показателями комбинированного пренатального скрининга беременных I триместра. В сыворотке крови беременных на ранних сроках повышенный уровень экзосомных SUMO 2/3/4 и UBC9 обратно коррелировал с концентрацией PLGF, что хорошо согласуется с нашими предыдущими данными. Кроме того, обнаруженная взаимосвязь подтверждает регуляцию плацентарного фактора посредством сумоилирования и дает основание предполагать специфичность SUMO 2/3/4 и UBC9 по отношению к PLGF. Интересно, что эта взаимосвязь установлена только для ранней формы ПЭ. Примечательно, что помимо взаимосвязи с плацентарным фактором, обнаружены значимые корреляции экспрессии всех конъюгированных изоформ SUMO и hnRNPA2/B1 с пульсационным индексом маточной артерии, а UBC9 коррелировал с показателем среднего артериального давления. Особенность в том, что при поздней форме ПЭ повышенный уровень SUMO 2/3/4 обратно коррелировал с PAPP-A, а UBC9 и hnRNPA2/B1 — с концентрацией β -ХГЧ. При этом не обнаружено корреляций SUMO 1 ни с одним из показателей. Низкие концентрации β -ХГЧ и PAPP-A в I триместре беременности связывают с риском развития ПЭ и ЗРП [55–57].

Учитывая результаты корреляционного анализа, а также отсутствие данных о прогностическом потенциале модификаций SUMO, мы создали модели логистической регрессии с ROC-кривыми для оценки возможности использования исследуемых экзосомных белков в качестве потенциальных предикторов риска развития ПЭ на ранних сроках беременности. В модели предикции ранней ПЭ определены значимые коэффициенты для UBC9 (AUC = 0,88; Se-0,72; Sp-1), а поздней ПЭ — для SUMO 1 (AUC = 0,79; Se-0,8; Sp-0,77). Кроме этого, на основе оценки экспрессии UBC9, hnRNPA2/B1 (AUC = 0,94; Se-0,80; Sp-1) и SUMO 1 (AUC = 0,91; Se-0,88; Sp-1) возможно дифференцировать беременных с высоким риском развития ПЭ по данным комбинированного скрининга I триместра от беременных с ПЭ и с физиологической беременностью соответственно. Мы обратили внимание на то, что SUMO 2/3/4 не достиг значимого уровня ни в одной из моделей. Тем не менее, полученные результаты позволяют предположить дифференциальную специфичность UBC9 и SUMO 1 в патогенезе подтипов ПЭ, а также различную функциональную роль белков SUMO при плацентарной дисфункции в целом, что важно для превентивной терапевтической стратегии. Бесспорно, использование прогностических моделей потребует последующей валидации на большой когорте беременных с соответствующими клиническими исходами, включая изолированные формы ПЭ и ЗРП.

Выводы

Основная ценность настоящего исследования заключается в том, что оно открывает несколько поисковых направлений для предикции состояний, связанных с плацентарной дисфункцией, на основе изучения паттерна сумоилирования экзосомного контента. Это первые данные об экзосомной экспрессии конъюгированных изоформ SUMO 1–4, а также UBC9 и hnRNPA2/B1, дифференциально изменяющейся на ранних сроках у беременных с ПЭ. Возможность прогноза данной патологии может быть обусловлена функциональной специфичностью изоформ SUMO, а также механизмом конъюгации/деконъюгации, с помощью которого осуществляется координация сигнальных путей. Стоит отметить, что наше исследование имеет ограничение, которое связано с небольшим размером выборки в каждой когорте. Мы обратили на это внимание, поскольку для валидации прогностических моделей необходимо расширение когорт беременных. Кроме того, в данной работе мы не оценивали экспрессию белков в экзосомах, осуществляющих деконъюгацию SUMO с субстратами. Это можно рассматривать в качестве перспективы для будущих исследований, как и изучение самих субстратов, вовлеченных в регуляцию при плацентарной дисфункции.

Литература

1. Ilekis JV, Tsilou E, Fisher S, et al. Placental origins of adverse pregnancy outcomes: potential molecular targets: an Executive Workshop Summary of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016; 215 (1): S1–S46.
2. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives. 2019; *Circ Res*. 124 (7): 1094–1112.
3. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *Journal of Reproductive Immunology*. 2019; 134–135: 1–10.
4. Tenório MB, Ferreira RC, Moura FA, Bueno NB, de Oliveira ACM, Goulart MOF. Cross-Talk between Oxidative Stress and Inflammation in Preeclampsia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019; 2019: 1–26.
5. Melchiorre K, Giorgione V, Thilaganathan B. The placenta and

- preeclampsia: villain or victim? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022; 226 (2): S954–S962.
6. Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2014; 101 (4): 579–86.
 7. Ritz E, Amann K, Koleganova N, Benz K. Prenatal programming—effects on blood pressure and renal function. *Nat Rev Nephrol*. 2011; 7 (3): 137–44.
 8. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on preeclampsia: a pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynecol Obstet*. 2019; 145 (S1): 1–33.
 9. ACOG. *Obstetrics & Gynecology*. 2019; 133 (1): 1–1.
 10. Yagel S, Cohen SM, Goldman-Wohl D. An integrated model of preeclampsia: a multifaceted syndrome of the maternal cardiovascular-placental-fetal array. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2022; 226 (2): S963–S972.
 11. Gobble RM, Groesch KA, Chang M, Torry RJ, Torry DS. Differential regulation of human PlGF gene expression in trophoblast and nontrophoblast cells by oxygen tension. *Placenta*. 2009; 30 (10): 869–75.
 12. Chang M, Mukherjee D, Gobble RM, Groesch KA, Torry RJ, Torry DS. Glial cell missing regulates Placental Growth Factor (PGF) gene transcription in human trophoblast. *Biology of Reproduction*. 2008; 78 (5): 841–51.
 13. Baczyk D, Kibschull M, Mellstrom B, et al. DREAM mediated regulation of GCM1 in the human placental trophoblast. *PLoS ONE*. 2013; 8 (1): e51837.
 14. Chou C-C, Chang C, Liu J-H, Chen L-F, Hsiao C-D, Chen H. Small ubiquitin-like modifier modification regulates the DNA binding activity of glial cell missing *Drosophila* Homolog a. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282 (37): 27239–49.
 15. Enserink JM. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div*. 2015; 10 (1): 4.
 16. He J, Cheng J, Wang T. SUMOylation-Mediated Response to Mitochondrial Stress. *IJMS*. 2020; 21 (16): 5657.
 17. Kunz K, Wagner K, Mendler L, Hölper S, Dehne N, Müller S. SUMO signaling by hypoxic inactivation of SUMO-specific isopeptidases. *Cell Reports*. 2016; 16 (11): 3075–86.
 18. Karhausen J, Ulloa L, Yang W. SUMOylation connects cell stress responses and inflammatory control: lessons from the gut as a model organ. *Front Immunol*. 2021; 12: 646633.
 19. Chang H-M, Yeh ETH. SUMO: from bench to bedside. *Physiological Reviews*. 2020; 100 (4): 1599–619.
 20. Baczyk D, Drewlo S, Kingdom JCP. Emerging role of SUMOylation in placental pathology. *Placenta*. 2013; 34 (7): 606–12.
 21. Kondoh K, Akahori H, Muto Y, Terada T. Identification of key genes and pathways associated with preeclampsia by a WGCNA and an evolutionary approach. *Genes*. 2022; 13 (11): 2134.
 22. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 2021; 19 (1): 47.
 23. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14 (3): 195–208.
 24. Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS ONE*. 2013; 8 (11): e79636.
 25. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and Endoglin. *PLoS ONE*. 2013; 8 (2): e56754.
 26. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, et al. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: potential role of exosomal microRNAs across gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017; 102 (9): 3182–94.
 27. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013; 4 (1): 2980.
 28. Gusar VA, Timofeeva AV, Chagovets VV, Kan NE, Ivanets TYu, Sukhikh GT. Regulation of the placental growth factor mediated by sumoylation and expression of miR-652-3p in pregnant women with early-onset preeclampsia. *Bull Exp Biol Med*. 2022; 174 (1): 174–8.
 29. Gusar V, Timofeeva A, Chagovets V, et al. Diagnostic potential of exosomal hypoxamiRs in the context of hypoxia–sumoylation–hypoxamiRs in early onset preeclampsia at the preclinical stage. *Life*. 2022; 12 (1): 101.
 30. Chiarello DI, Salsoso R, Toledo F, Mate A, Vázquez CM, Sobrevia L. Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine*. 2018; 60: 69–80.
 31. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, et al. A Gestational Ppofile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS ONE*. 2014; 9 (6): e98667.
 32. Tannetta D, Collett G, Vatish M, Redman C, Sargent I. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles — Circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta*. 2017; 52: 134–8.
 33. Hendriks IA, D'Souza RCJ, Yang B, Verlaan-de Vries M, Mann M, Verteegaal ACO. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol*. 2014; 21 (10): 927–36.
 34. Hay RT. SUMO. *Molecular Cell*. 2005; 18 (1): 1–12.
 35. Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Levytska K, Kingdom JC. SUMO-4: a novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS ONE*. 2017; 12 (5): e0178056.
 36. Anderson DB, Wilkinson KA, Henley JM. Protein SUMOylation in neuropathological conditions. *Drug News & Perspectives*. 2009; 22 (5): 255.
 37. Bawa-Khalife T, Yeh ETH. SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and Progression. *Genes & Cancer*. 2010; 1 (7): 748–52.
 38. Baczyk D, Audette MC, Coyaud E, Raught B, Kingdom JC. Spatiotemporal distribution of small ubiquitin-like modifiers during human placental development and in response to oxidative and inflammatory stress: Placental distribution of small ubiquitin-like modifiers. *J Physiol*. 2018; 596 (9): 1587–600.
 39. Saitoh H, Hinchev J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275 (9): 6252–8.
 40. Hasegawa Y, Yoshida D, Nakamura Y, Sakakibara S. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development: Sumo-ylation during brain development. *J Comp Neurol*. 2014; 522 (13): 3020–36.
 41. Chalkiadaki A, Talianidis I. SUMO-dependent compartmentalization in promyelocytic leukemia protein nuclear bodies prevents the access of LRF-1 to chromatin. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25 (12): 5095–105.
 42. Snider NT, Omary MB. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15 (3): 163–77.
 43. Vassileva MT, Matunis MJ. SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24 (9): 3623–32.
 44. Verteegaal ACO, Ogg SC, Jaffray E, et al. A Proteomic study of SUMO-2 target proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279 (32): 33791–8.
 45. Bhattacharjee J, Alahari S, Sallais J, Tagliaferro A, Post M, Caniggia I. Dynamic regulation of HIF1A stability by SUMO2/3 and SENP3 in the human placenta. *Placenta*. 2016; 40: 8–17.
 46. Xu Y, Zuo Y, Zhang H, et al. Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285 (47): 36682–8.
 47. Zhou HJ, Xu Z, Wang Z, et al. SUMOylation of VEGFR2 regulates its intracellular trafficking and pathological angiogenesis. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3303.
 48. McCaig D, Lyall F. Hypoxia upregulates GCM1 in human placenta explants. *hypertension in pregnancy*. 2009; 28 (4): 457–72.
 49. Kohli S, Hoffmann J, Lochmann F, et al. p45 NF-E2 regulates syncytiotrophoblast differentiation by post-translational GCM1 modifications in human intrauterine growth restriction. *Cell Death Dis*. 2017; 8 (4): e2730–e2730.
 50. Chang C-W, Chang G-D, Chen H. A novel cyclic AMP/Epac1/CaMKI signaling cascade promotes GCM1 desumoylation and placental cell fusion. *Molecular and Cellular Biology*. 2011; 31 (18): 3820–31.

51. Luo J, Ashikaga E, Rubin PP, et al. Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO. *Neuromol Med.* 2013; 15 (4): 692–706.
52. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003; 111 (5): 649–58.
53. Redman CWG, Staff AC. Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2015; 213 (4): S9.e1-S9.e4.
54. Dymara-Konopka W, Laskowska M, Grywalska E, Hymos A, Błażewicz A, Leszczyńska-Gorzela B. Similar pro- and antiangiogenic profiles close to delivery in different clinical presentations of two pregnancy syndromes: preeclampsia and fetal growth restriction. *IJMS.* 2023; 24 (2): 972.
55. Keikkala E, Vuorela P, Laivuori H, Romppanen J, Heinonen S, Stenman U-H. First trimester hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin in serum — a marker of early-onset preeclampsia. *Placenta.* 2013; 34 (11): 1059–65.
56. Morris RK, Bilagi A, Devani P, Kilby MD. Association of serum PAPP-A levels in first trimester with small for gestational age and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis: Systematic review association serum PAPP-A and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2017; 37 (3): 253–65.
57. Krantz D, Goetzl L, Simpson JL, et al. Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin- β , pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2004; 191 (4): 1452–8.

References

1. Ilekis JV, Tsilou E, Fisher S, et al. Placental origins of adverse pregnancy outcomes: potential molecular targets: an Executive Workshop Summary of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2016; 215 (1): S1–S46.
2. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: pathophysiology, challenges, and perspectives. *Circ Res.* 2019; 124 (7): 1094–1112.
3. Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. *Journal of Reproductive Immunology.* 2019; 134–135: 1–10.
4. Tenório MB, Ferreira RC, Moura FA, Bueno NB, de Oliveira ACM, Goulart MOF. Cross-Talk between Oxidative Stress and Inflammation in Preeclampsia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019; 2019: 1–26.
5. Melchiorre K, Giorgione V, Thilaganathan B. The placenta and preeclampsia: villain or victim? *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2022; 226 (2): S954–S962.
6. Chen CW, Jaffe IZ, Karumanchi SA. Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research.* 2014; 101 (4): 579–86.
7. Ritz E, Amann K, Koleganova N, Benz K. Prenatal programming—effects on blood pressure and renal function. *Nat Rev Nephrol.* 2011; 7 (3): 137–44.
8. Poon LC, Shennan A, Hyett JA, et al. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) initiative on preeclampsia: a pragmatic guide for first-trimester screening and prevention. *Int J Gynecol Obstet.* 2019; 145 (S1): 1–33.
9. ACOG. *Obstetrics & Gynecology.* 2019; 133 (1): 1–1.
10. Yagel S, Cohen SM, Goldman-Wohl D. An integrated model of preeclampsia: a multifaceted syndrome of the maternal cardiovascular-placental-fetal array. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2022; 226 (2): S963–S972.
11. Gobble RM, Groesch KA, Chang M, Torry RJ, Torry DS. Differential regulation of human PIGF gene expression in trophoblast and nontrophoblast cells by oxygen tension. *Placenta.* 2009; 30 (10): 869–75.
12. Chang M, Mukherjee D, Gobble RM, Groesch KA, Torry RJ, Torry DS. Glial cell missing regulates Placental Growth Factor (PGF) gene transcription in human trophoblast. *Biology of Reproduction.* 2008; 78 (5): 841–51.
13. Baczyk D, Kibschull M, Mellstrom B, et al. DREAM mediated regulation of GCM1 in the human placental trophoblast. *PLoS ONE.* 2013; 8 (1): e51837.
14. Chou C-C, Chang C, Liu J-H, Chen L-F, Hsiao C-D, Chen H. Small ubiquitin-like modifier modification regulates the DNA binding activity of glial cell missing *Drosophila Homolog a.* *Journal of Biological Chemistry.* 2007; 282 (37): 27239–49.
15. Enserink JM. Sumo and the cellular stress response. *Cell Div.* 2015; 10 (1): 4.
16. He J, Cheng J, Wang T. SUMOylation-Mediated Response to Mitochondrial Stress. *IJMS.* 2020; 21 (16): 5657.
17. Kunz K, Wagner K, Mendl L, Hölper S, Dehn N, Müller S. SUMO signaling by hypoxic inactivation of SUMO-specific isopeptidases. *Cell Reports.* 2016; 16 (11): 3075–86.
18. Karhausen J, Ulloa L, Yang W. SUMOylation connects cell stress responses and inflammatory control: lessons from the gut as a model organ. *Front Immunol.* 2021; 12: 646633.
19. Chang H-M, Yeh ETH. SUMO: from bench to bedside. *Physiological Reviews.* 2020; 100 (4): 1599–619.
20. Baczyk D, Drewlo S, Kingdom JCP. Emerging role of SUMOylation in placental pathology. *Placenta.* 2013; 34 (7): 606–12.
21. Kondoh K, Akahori H, Muto Y, Terada T. Identification of key genes and pathways associated with preeclampsia by a WGCNA and an evolutionary approach. *Genes.* 2022; 13 (11): 2134.
22. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal.* 2021; 19 (1): 47.
23. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2014; 14 (3): 195–208.
24. Salomon C, Kobayashi M, Ashman K, Sobrevia L, Mitchell MD, Rice GE. Hypoxia-induced changes in the bioactivity of cytotrophoblast-derived exosomes. *PLoS ONE.* 2013; 8 (11): e79636.
25. Tannetta DS, Dragovic RA, Gardiner C, Redman CW, Sargent IL. Characterisation of syncytiotrophoblast vesicles in normal pregnancy and pre-eclampsia: expression of Flt-1 and Endoglin. *PLoS ONE.* 2013; 8 (2): e56754.
26. Salomon C, Guanzon D, Scholz-Romero K, et al. Placental exosomes as early biomarker of preeclampsia: potential role of exosomal microRNAs across gestation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2017; 102 (9): 3182–94.
27. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun.* 2013; 4 (1): 2980.
28. Gusar VA, Timofeeva AV, Chagovets VV, Kan NE, Ivanets TYu, Sukhikh GT. Regulation of the placental growth factor mediated by sumoylation and expression of miR-652-3p in pregnant women with early-onset preeclampsia. *Bull Exp Biol Med.* 2022; 174 (1): 174–8.
29. Gusar V, Timofeeva A, Chagovets V, et al. Diagnostic potential of exosomal hypoxamiRs in the context of hypoxia–sumoylation–hypoxamiRs in early onset preeclampsia at the preclinical stage. *Life.* 2022; 12 (1): 101.
30. Chiarello DI, Salsoso R, Toledo F, Mate A, Vázquez CM, Sobrevia L. Foetoplacental communication via extracellular vesicles in normal pregnancy and preeclampsia. *Molecular Aspects of Medicine.* 2018; 60: 69–80.
31. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, et al. A Gestational Pprofile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration. *PLoS ONE.* 2014; 9 (6): e98667.
32. Tannetta D, Collett G, Vatish M, Redman C, Sargent I. Syncytiotrophoblast extracellular vesicles — Circulating biopsies reflecting placental health. *Placenta.* 2017; 52: 134–8.
33. Hendriks IA, D'Souza RCJ, Yang B, Verlaan-de Vries M, Mann M, Vertegaal ACO. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat Struct Mol Biol.* 2014; 21 (10): 927–36.

34. Hay RT. SUMO. *Molecular Cell*. 2005; 18 (1): 1–12.
35. Baczyk D, Audette MC, Drewlo S, Lewytska K, Kingdom JC. SUMO-4: a novel functional candidate in the human placental protein SUMOylation machinery. *PLoS ONE*. 2017; 12 (5): e0178056.
36. Anderson DB, Wilkinson KA, Henley JM. Protein SUMOylation in neuropathological conditions. *Drug News & Perspectives*. 2009; 22 (5): 255.
37. Bawa-Khalife T, Yeh ETH. SUMO losing balance: SUMO proteases disrupt SUMO homeostasis to facilitate cancer development and progression. *Genes & Cancer*. 2010; 1 (7): 748–52.
38. Baczyk D, Audette MC, Coyaud E, Raught B, Kingdom JC. Spatiotemporal distribution of small ubiquitin-like modifiers during human placental development and in response to oxidative and inflammatory stress: Placental distribution of small ubiquitin-like modifiers. *J Physiol*. 2018; 596 (9): 1587–600.
39. Saitoh H, Hinchev J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275 (9): 6252–8.
40. Hasegawa Y, Yoshida D, Nakamura Y, Sakakibara S. Spatiotemporal distribution of SUMOylation components during mouse brain development: Sumo-ylation during brain development. *J Comp Neurol*. 2014; 522 (13): 3020–36.
41. Chalkiadaki A, Talianidis I. SUMO-dependent compartmentalization in promyelocytic leukemia protein nuclear bodies prevents the access of LRF-1 to chromatin. *Molecular and Cellular Biology*. 2005; 25 (12): 5095–105.
42. Snider NT, Omary MB. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15 (3): 163–77.
43. Vassileva MT, Matunis MJ. SUMO modification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins. *Molecular and Cellular Biology*. 2004; 24 (9): 3623–32.
44. Vertegaal ACO, Ogg SC, Jaffray E, et al. A Proteomic study of SUMO-2 target proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279 (32): 33791–8.
45. Bhattacharjee J, Alahari S, Sallais J, Tagliaferro A, Post M, Caniggia I. Dynamic regulation of HIF1A stability by SUMO2/3 and SENP3 in the human placenta. *Placenta*. 2016; 40: 8–17.
46. Xu Y, Zuo Y, Zhang H, et al. Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285 (47): 36682–8.
47. Zhou HJ, Xu Z, Wang Z, et al. SUMOylation of VEGFR2 regulates its intracellular trafficking and pathological angiogenesis. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3303.
48. McCaig D, Lyall F. Hypoxia upregulates GCM1 in human placenta explants. *hypertension in pregnancy*. 2009; 28 (4): 457–72.
49. Kohli S, Hoffmann J, Lochmann F, et al. p45 NF-E2 regulates syncytiotrophoblast differentiation by post-translational GCM1 modifications in human intrauterine growth restriction. *Cell Death Dis*. 2017; 8 (4): e2730–e2730.
50. Chang C-W, Chang G-D, Chen H. A novel cyclic AMP/Epac1/CaMKII signaling cascade promotes GCM1 desumoylation and placental cell fusion. *Molecular and Cellular Biology*. 2011; 31 (18): 3820–31.
51. Luo J, Ashikaga E, Rubin PP, et al. Receptor trafficking and the regulation of synaptic plasticity by SUMO. *Neuromol Med*. 2013; 15 (4): 692–706.
52. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003; 111 (5): 649–58.
53. Redman CWG, Staff AC. Preeclampsia, biomarkers, syncytiotrophoblast stress, and placental capacity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2015; 213 (4): S9.e1–S9.e4.
54. Dymara-Konopka W, Laskowska M, Grywalska E, Hymos A, Błażewicz A, Leszczyńska-Gorzela B. Similar pro- and antiangiogenic profiles close to delivery in different clinical presentations of two pregnancy syndromes: preeclampsia and fetal growth restriction. *IJMS*. 2023; 24 (2): 972.
55. Keikkala E, Vuorela P, Laivuori H, Romppanen J, Heinonen S, Stenman U-H. First trimester hyperglycosylated human chorionic gonadotrophin in serum — a marker of early-onset preeclampsia. *Placenta*. 2013; 34 (11): 1059–65.
56. Morris RK, Bilagi A, Devani P, Kilby MD. Association of serum PAPP-A levels in first trimester with small for gestational age and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis: Systematic review association serum PAPP-A and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn*. 2017; 37 (3): 253–65.
57. Krantz D, Goetzl L, Simpson JL, et al. Association of extreme first-trimester free human chorionic gonadotropin-β, pregnancy-associated plasma protein A, and nuchal translucency with intrauterine growth restriction and other adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004; 191 (4): 1452–8.

ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА У ЖЕНЩИН С ИДИОПАТИЧЕСКИМ ПРИВЫЧНЫМ ВЫКИДЫШЕМ

Л. Н. Гуменюк [✉], М. Д. Бордюгов, Е. В. Сарчук, С. В. Князева, В. А. Заставский, Д. В. Крицкая, Ш. Э. Сайтибрагимова, А. И. Куртвелиева
 Медицинский институт имени С. И. Георгиевского (структурное подразделение Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского), Симферополь, Россия

В настоящее время существенный интерес у исследователей вызывает сопряженность микробиоты кишечника и идиопатического привычного выкидыша (ИПВ). Целью работы было проанализировать изменения таксономического состава микробиоты кишечника и оценить на уровне родов их взаимосвязь с показателями в плазме крови кортизола, мелатонина, TNF α и IL17 у женщин с ИПВ. У 55 женщин с ИПВ и 60 женщин с физиологически протекающей беременностью изучали таксономический состав микробиоты кишечника, концентрацию в сыворотке крови кортизола, мелатонина, TNF α и IL17. Установлено, что у женщин с ИПВ изменения таксономического состава микробиоты кишечника характеризуются статистически значимым снижением α -разнообразия бактериального сообщества (индекс Chao1, $p = 0,014$), представленности *Bifidobacterium* ($p < 0,001$), *Lachnospira* ($p = 0,032$), *Roseburia* ($p = 0,003$), *Coprococcus* ($p = 0,012$) и увеличением представленности *Ruminococcus* ($p < 0,001$) и *Klebsiella* ($p = 0,002$). Продемонстрировано наличие статистически значимой взаимосвязи между значениями кортизола и представленностью бактерий *Lachnospira* ($r = -0,51$; $p = 0,002$), мелатонина и представленностью бактерий *Coprococcus* ($r = -0,49$; $p = 0,012$). Выявлена также взаимосвязь между концентрацией TNF α и IL17 и индексом Chao1 ($r = -0,51$; $p = 0,002$, $r = -0,54$; $p = 0,001$ соответственно), TNF α и представленностью бактерий *Ruminococcus* ($r = 0,51$; $p = 0,002$), IL17 и представленностью *Bifidobacterium* ($r = -0,52$; $p = 0,001$). Коррекция микробиоты кишечника может иметь потенциальную профилактическую и терапевтическую значимость для женщин с ИПВ.

Ключевые слова: идиопатический привычный выкидыш, микробиота кишечника, кортизол, мелатонин, TNF α , IL17

Вклад авторов: Л. Н. Гуменюк — идея и дизайн исследования; М. Д. Бордюгов, Е. В. Сарчук — сбор, анализ и интерпретация данных; С. В. Князева, В. А. Заставский — статистическая обработка данных; Д. В. Крицкая, Ш. Э. Сайтибрагимова, А. И. Куртвелиева — написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Медицинского института имени С. И. Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» (протокол № 10 от 16 октября 2021 г.), спланировано и проведено в соответствии с Хельсинской декларацией. Все лица, включенные в исследование, подписали добровольное информированное согласие.

✉ **Для корреспонденции:** Леся Николаевна Гуменюк
 бул. Ленина, 5/7, 295006, г. Симферополь, Республика Крым; lesya_gumenyuk@mail.ru

Статья получена: 04.01.2024 **Статья принята к печати:** 02.02.2024 **Опубликована онлайн:** 20.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.004

SPECIFICS OF GUT MICROBIOTA IN WOMEN WITH IDIOPATHIC RECURRENT MISCARRIAGE

Gumenyuk LN [✉], Bordyugov MD, Sarchuk EV, Knyazeva SV, Zastavskii VA, Krickaya DV, Saitibragimova SE, Kurtvelieva AI

Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

Currently, researchers show considerable interest in the link between gut microbiota and idiopathic recurrent miscarriage (IRM). This study aimed to analyze taxonomic changes of gut microbiota and assess its relationship with plasma levels of cortisol, melatonin, TNF α and IL17 in women with IRM. We invited 55 women with IRM and 60 women with normal pregnancy, studied their gut microbiota, and registered serum concentrations of cortisol, melatonin, TNF α and IL17. Women with IRM had changed gut microbiota: significantly decreased — diversity (Chao1 $p = 0,014$), significantly decreased abundance of *Bifidobacterium* ($p < 0,001$), *Lachnospira* ($p = 0,032$), *Roseburia* ($p = 0,003$), *Coprococcus* ($p = 0,012$), and significantly increased abundance of *Ruminococcus* ($p < 0,001$) and *Klebsiella* ($p = 0,002$). We have shown a statistically significant relationship between cortisol level and abundance of *Lachnospira* ($r = -0,51$; $p = 0,002$), melatonin level and abundance of *Coprococcus* ($r = -0,49$; $p = 0,012$), and identified connections between TNF and IL17 concentrations and Chao1 index ($r = -0,51$; $p = 0,002$, $r = -0,54$; $p = 0,001$, respectively), TNF concentration and abundance of *Ruminococcus* ($r = 0,51$; $p = 0,002$), IL17 concentration and abundance of *Bifidobacterium* ($r = -0,52$; $p = 0,001$). Modulation of gut microbiota may have preventive and therapeutic effects in women with IRM.

Keywords: idiopathic recurrent miscarriage, gut microbiota, cortisol, melatonin, TNF α , IL17

Author contribution: Gumenyuk LN — study idea and design; Bordyugov MD, Sarchuk EV — data collection, analysis and interpretation; Knyazeva SV, Zastavskii VA — statistical data processing; Krickaya DV, Saitibragimova SE, Kurtvelieva AI — article authoring.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Medical Academy named after S. I. Georgievsky of Vernadsky Crimean Federal University (Minutes № 10 of October 16, 2021); it was planned and conducted in compliance with the Declaration of Helsinki. All participants of the study signed the voluntary informed consent form.

✉ **Correspondence should be addressed:** Lesya N. Gumenyuk
 Bul'var Lenina, 5/7, 295006, Simferopol, Republic of Crimea; lesya_gumenyuk@mail.ru

Received: 04.01.2024 **Accepted:** 02.02.2024 **Published online:** 20.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.004

Привычный выкидыш (ПВ) — это гетерогенное состояние, определяемое как две и более клинические потери беременности в сроках до 22 недель гестации [1] и имеющее место у 2–5% беременных женщин [2]. После двух предыдущих выкидышей риск прерывания беременности возрастает более чем в два раза и достигает 36–38% [3].

Среди этиологических факторов ПВ выделяют такие, как хромосомные аномалии (2–6%), анатомические изменения матки (10–15%), инфекционно-воспалительные

(2–6%), эндокринные (17–20%), аутоиммунные (20%) заболевания [4], тромбофилические состояния (10%) [5]. Тем не менее, причины около 50% случаев ПВ являются необъяснимыми (идиопатическими) [6]. Идиопатический привычный выкидыш (ИПВ) остается актуальной проблемой репродуктивной медицины во всем мире [7].

В свете современных представлений одним из центральных звеньев патогенеза ИПВ является абберантное продуцирование провоспалительных цитокинов,

сопровождающееся дисрегуляцией иммунного ответа [8, 9]. В данном аспекте особый интерес представляют фактор некроза опухоли альфа (TNF α) [10] и интерлейкин IL17 [11], обладающие эмбриотоксической и антитрофобластной активностью [12]. Есть данные, что значительное повышение уровня TNF α в периферической крови характерно для женщин с ИПВ (на 40–70% по сравнению с контролем) [13], в том числе связано с инициированием апоптоза [14] и ингибированием инвазии трофобласта [15], активацией тромбокиназы [16] снижением экспрессии нуклеотид-связывающего домена олигомеризации [17] и усилением цитотоксичности клеток dNK [18], что, в свою очередь, приводит к недостаточному ремоделированию спиральной артерии [16], тромбозам, инфарктам трофобласта и его отслойки [16], нарушению функций децидуальных клеток [17], иммунологическому отторжению плода [18], и, как следствие, к выкидышу. Большинство исследователей считает, что уровень IL17 в сыворотке крови у женщин с ИПВ повышен [11] и служит независимым прогностическим фактором ИПВ [19]. Повышенный уровень IL17 обратно коррелирует с содержанием T_{reg}-клеток в периферической крови и децидуальной оболочке [20], снижение уровня которых потенцирует процессы отторжения эмбриона [21]; независимо связан с активацией экспрессии транскрипционного ядерного фактора NF-kB, сокращением уровня экспрессии рецепторов прогестерона и ослаблением его функциональной активности, что, приводит к децидуадисплазии, недостаточной нутриетивной поддержке эмбриона, стимуляции сократимости миомеритрия и, в конечном счете, к выкидышу [22].

Вместе с тем иммунная система тесно сопряжена с нейроэндокринной. В литературе активно обсуждается вовлеченность дисрегуляции эпифизарно-гипофизарно-надпочечниковой оси в повышении риска ИПВ, и при этом особое значение имеют изменения секреции мелатонина и кортизола [23, 24]. Оценка гормонального профиля крови у женщин с ИПВ позволила обнаружить повышенные уровни кортизола и сниженные уровни мелатонина [24, 25]. Кроме того, изменения уровня кортизола были связаны с важными этиологическими факторами ИПВ, такими как снижение фибринолитической активности сосудистой стенки, нарушение процессов полноценной инвазии и функций трофобласта [26, 27], индукция апоптоза [28], ингибирование секреции прогестерона [29]. В свою очередь снижение уровня мелатонина в крови ассоциировано с иммунологическим отторжением трофобласта (за счет ингибирования секреции прогестерона) и стимуляцией сократимости миомеритрия (путем усиления синтеза простагландинов) [30].

Современные исследования свидетельствуют о роли кишечной микробиоты в патофизиологии ИПВ, что объясняется ее ключевой ролью в формировании и модуляции нейро-иммунно-эндокринных реакций. Так, представлены убедительные данные о качественных изменениях микробного ландшафта у женщин с ИПВ [31]. В целом, у женщин с ИПВ зафиксирована тенденция к уменьшению видового разнообразия бактерий, истощению полезных комменсалов и обогащению патобионтами [32–33], однако информация о родовом составе фрагментарна и противоречива. Кроме того, в литературе имеются лишь единичные сообщения о сопряженности между микробиотой кишечника и воспалительными биохимическими маркерами у женщин с ИПВ. Отсутствуют работы, оценивающие взаимосвязь

представителей микробиоты кишечника с концентрацией кортизола и мелатонина при ИПВ.

Таким образом, проблема взаимосвязи микробиоты кишечника и ИПВ остается актуальной. Целью нашего исследования было изучить изменения таксономического состава микробиоты кишечника и оценить на уровне родов его взаимосвязь с показателями в сыворотке крови кортизола, мелатонина, TNF α и IL17 у женщин с ИПВ.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе гинекологического отделения Структурного подразделения Перинатального центра ГБУЗ РКБ им. Н. А. Семашко (г. Симферополь). В проспективное сравнительное одномоментное исследование были включены 55 женщин с первичным ИПВ (медиана возраста — 31,6 [26,9; 33,9] года), которые составили основную группу (ОГ), и 60 женщин с физиологически протекающей беременностью (ФГБ) (медиана возраста — 30,3 [25,9; 33,2] года), обратившихся по поводу проведения аборта (контрольная группа, КГ).

Критерии включения в ОГ: подтвержденный диагноз ИПВ; возраст женщин — до 35 лет; нормальный кариотип пары.

Критерии невключения в ОГ: дефицит или избыточная масса тела; наличие генетических и анатомических причин ПВ; хронические инфекционные, воспалительные, эндокринные, аутоиммунные, тромбофилические, онкологические заболевания; синдром раздраженного кишечника; хронические заболевания пищеварительной и гепатобилиарной системы; бактериальные, вирусные и грибковые инфекционные заболевания; психическая патология; злоупотребление табакокурением; изменения стула (диарея/запоры) и прием средств, влияющих на стул в предшествующие 30 дней до включения в исследование; вакцинация за 60 дней до включения в исследование; прием антибактериальных, пробиотических, пребиотических, противовирусных, симбиотических или кислотоподавляющих средств в предшествующие 90 дней до включения в исследование.

Критерии включения в КГ: возраст — до 35 лет; физиологически протекающая беременность; неосложненный гинекологический и акушерский анамнез; наличие в анамнезе как минимум одной успешной беременности; отсутствие хронической экстрагенитальной патологии и аллергических реакций в анамнезе; отсутствие психической патологии в анамнезе; частота респираторных инфекций — не более трех раз в год; отсутствие инфекционных и острых заболеваний, изменений стула (диарея/запоры); прием средств, влияющих на стул, за 60 дней до включения в исследование; прием антибактериальных, пробиотических, пребиотических, противовирусных, симбиотических или кислотоподавляющих средств в предшествующие 90 дней до включения в исследование.

Критерии невключения в КГ: прегравидарный дефицит или избыточная масса тела; беременность, наступившая при помощи вспомогательных репродуктивных технологий; высокий риск выкидыша; повышение температуры тела более чем 36,9 °C.

Диагноз ПВ устанавливали по кодификационным критериям Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) [34].

У всех женщин с ИПВ и КГ был проведен анализ таксономического состава микробиоты кишечника.

Таблица 1. Характеристика пациенток с идиопатическим первичным выкидышем и здоровых женщин

Показатель	Женщины с ИПВ (n = 55)	Контрольная группа (n = 60)	p
Средний возраст, годы, медиана [25%; 75%]	31,6 [26,9; 33,9]	30,3 [25,9; 33,2]	0,122
Индекс массы тела, кг/м ² (m ± CD)	21,7 ± 0,4	20,6 ± 2,1	0,087
Количество выкидышей			
Два (n,%)	34 (61,8)	–	–
Три и более (n,%)	21 (38,2)	–	–

Примечание: ИПВ — идиопатический первичный выкидыш.

Образцы кала брали в день госпитализации, в утренние часы (8.00–11.00), после чего замораживали и хранили в пластиковых емкостях при температуре –80 °С до момента выполнения метагеномного анализа. Для выделения тотальной ДНК использовали метод фенольной экстракции. Библиотеки ДНК фрагментов генов 16S рРНК готовили по стандартному протоколу, рекомендованному производителем секвенатора MiSeq SOLiD5500 Wildfire (AppliedBiosystems; США) с использованием праймеров на переменные регионы V3 и V4 гена 16S рРНК [35]. Фильтрацию качества прочтений и их таксономическую классификацию проводили с использованием программного обеспечения QIIME версии 1.9.1 [36]. Идентификацию таксономической принадлежности прочтений осуществляли в два этапа: на первом этапе подбирали референсный набор операционных таксономических единиц (ОТЕ) бактерий на основе сравнения полученных нами прочтений генов 16S рРНК с базой данных GreenGenes версии 13.5 [37]; на втором этапе идентифицировали таксономическую принадлежность данных ОТЕ с помощью алгоритма RDP на основании

специализированной базы данных кишечной микробиоты человека HiTdb [38].

Оценку качественного и количественного состава микробиоты кишечника осуществляли на основе идентификации видов, родов и фил микроорганизмов. При этом α -разнообразие сообщества оценивали с помощью вычисления индекса Chao1, показатель числа обнаруженных таксонов (Sobs) и показатель, отражающий реальное количество таксонов (ACE), — с помощью программы Mothur v.1.22.0 (<https://www.mothur.org>).

Концентрацию кортизола, мелатонина, TNF α и IL17 в сыворотке крови определяли посредством твердофазного иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирм «Вектор-Бест» (Россия) и «Immuno Biological Laboratories» (Германия). Забор крови осуществляли пункцией кубитальной вены утром (7.00–10.00), натощак в состоянии покоя (как минимум 15 мин).

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0 (StatSoft.Inc.; США). Количественные показатели представлены в виде среднего значения

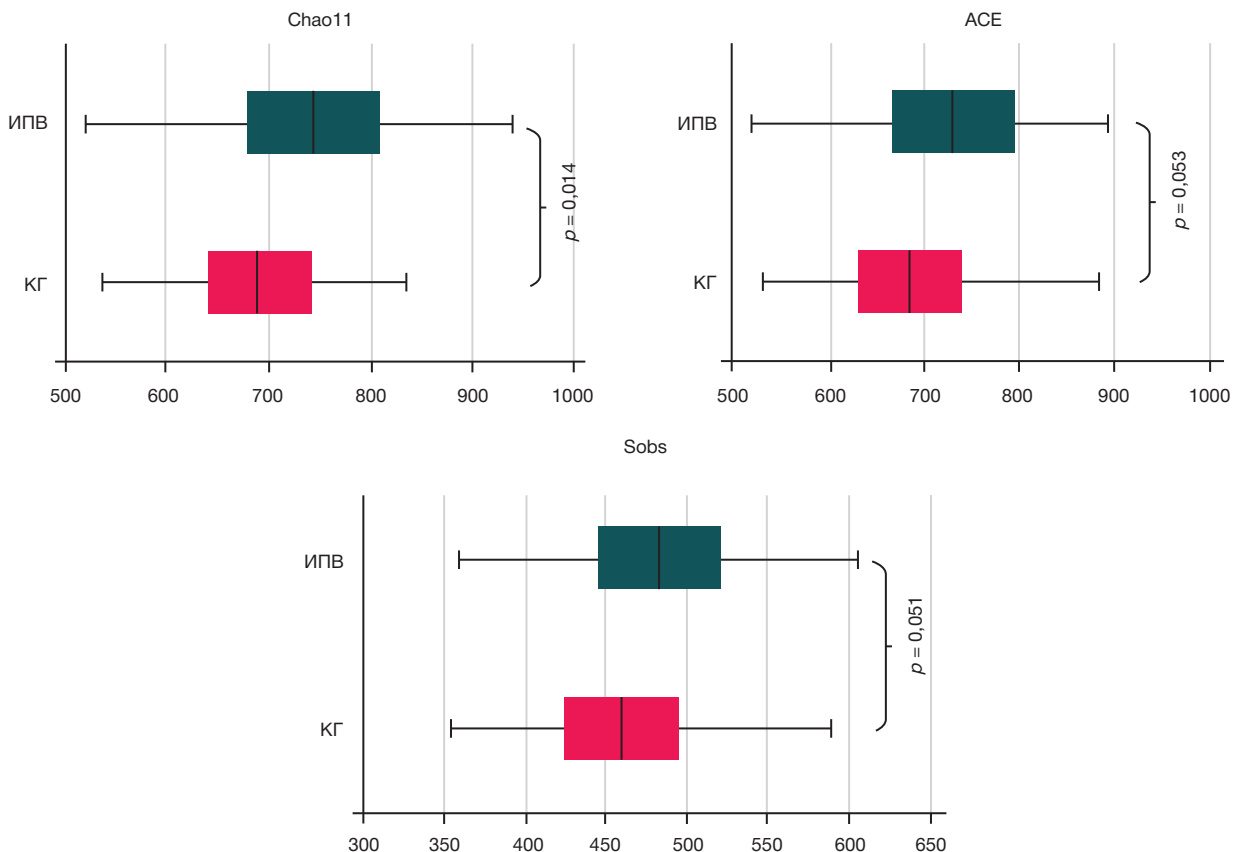


Рис. 1. Филогенетический состав микробиоты кишечника у пациенток с идиопатическим первичным выкидышем и здоровых женщин. ИПВ — идиопатический первичный выкидыш, КГ — контрольная группа

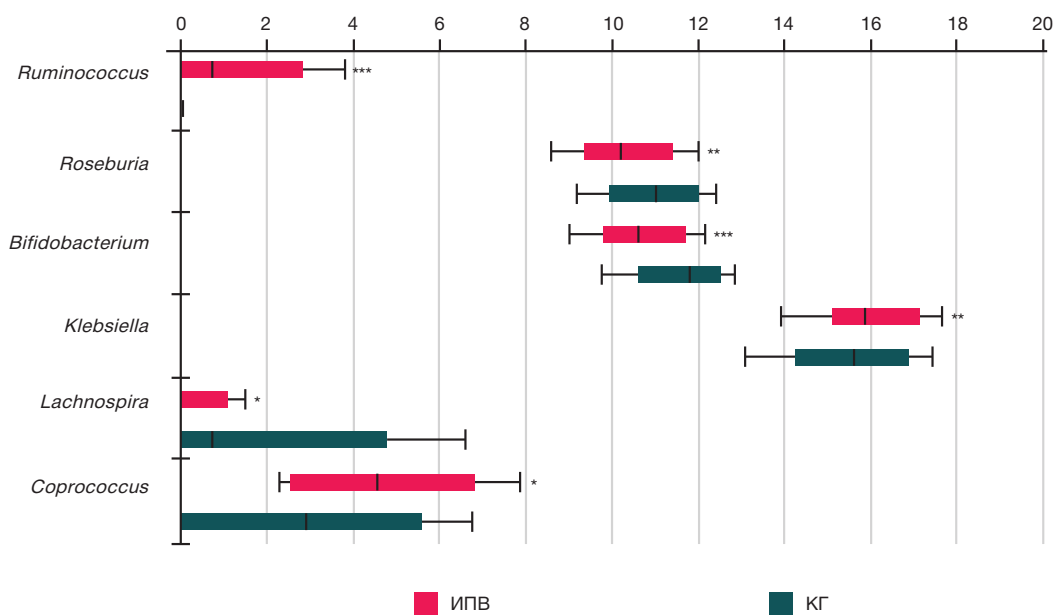


Рис. 2. Сравнительный анализ родового состава микробиоты кишечника у пациенток с идиопатическим первичным выкидышем и здоровых женщин. ИПВ — идиопатический первичный выкидыш, КГ — контрольная группа

и стандартного отклонения (при нормальном распределении признака) и в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го перцентилей (при распределении признака, отличном от нормального). Качественные признаки описывали с помощью абсолютного количества значений и процентных долей. Сравнение между группами по количественным показателям осуществляли с использованием параметрического t -критерия Стьюдента и U -критерия Манна-Уитни, по качественным — с использованием критерия χ^2 (хи-квадрат). Направление и тесноту взаимосвязи между показателями оценивали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика женщин с ИПВ и КГ представлена в табл. 1. Группы были сопоставимы по возрасту ($p = 0,122$) и индексу массы тела ($p = 0,087$).

Анализ таксономического состава микробиоты кишечника позволил выявить в группе женщин с ИПВ в сравнении с женщинами КГ статистически значимое снижение α -разнообразия бактериального сообщества (индекс Chao1, $p = 0,014$) и тенденцию к снижению индексов ACE и Sobs ($p = 0,053$ и $p = 0,051$ соответственно) (рис. 1).

Изменения родового состава кишечной микробиоты в группе женщин с ИПВ в сравнении с группой женщин КГ характеризовались статистически значимым снижением

представленности *Bifidobacterium* ($p < 0,001$), *Lachnospira* ($p = 0,032$), *Roseburia* ($p = 0,003$), *Coprococcus* ($p = 0,012$) и повышением представленности *Ruminococcus* ($p < 0,001$) и *Klebsiella* ($p = 0,002$) (рис. 2).

У женщин с ИПВ в сравнении с женщинами КГ плазменные значения кортизола, TNF α и IL17 были статистически значимо выше, а уровень мелатонина статистически значимо ниже (табл. 2).

Установлены статистически значимые корреляционные связи значений кортизола с представленностью бактерий *Lachnospira* ($r = -0,51$, $p = 0,002$). Так же удалось установить связь между значением мелатонина и представленностью бактерий *Coprococcus* ($r = -0,49$, $p = 0,012$). Выявлены взаимосвязи концентрации TNF α и IL17 с индексом Chao1 ($r = -0,51$, $p = 0,002$; $r = -0,54$, $p = 0,001$ соответственно). Концентрация TNF α положительно коррелировала с представленностью бактерий *Ruminococcus* ($r = 0,51$; $p = 0,002$), а концентрация IL17 имела обратную корреляционную связь с представленностью бактерий *Bifidobacterium* ($r = -0,52$, $p = 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании уточнены изменения таксономического состава микробиоты кишечника и изучена на уровне родов их связь с плазменными концентрациями кортизола, мелатонина, TNF α и IL17 в группе женщин с ИПВ.

В ряде ранее выполненных работ сообщается об изменении состава микробиоты кишечника у женщин

Таблица 2. Сравнительный анализ показателей кортизола, мелатонина, TNF α и IL17 в сыворотке крови у пациенток с идиопатическим первичным выкидышем и здоровых женщин

Показатель	Женщины с ИПВ (n = 55)	Контрольная группа (n = 60)	p
Кортизол, нмоль/л	627,1 ± 15,4	321,4 ± 33,2	< 0,001
Мелатонин, пг/мл	18,1 ± 5,3	31,6 ± 8,4	0,002
TNF α , пг/мл	12,3 ± 2,3	6,1 ± 1,4	0,001
IL17, пг/мл	5,2 ± 1,2	2,6 ± 1,3	0,011

Примечание: ИПВ — идиопатический первичный выкидыш.

с ИПВ [31–33]. Результаты данного исследования также показали, что состав микробиоты кишечника у женщин с ИПВ значительно отличается от такового у женщин с физиологически протекающей беременностью. По нашим данным, у женщин с ИПВ в сравнении с женщинами с физиологически протекающей беременностью наблюдается более низкое бактериальное α -разнообразие, что подтверждалось статистически более низким индексом Chao1 и согласуется с результатами ранее выполненных исследований [33, 39]. Кроме того, у женщин с ИПВ дисбиотические изменения кишечника характеризовались снижением представленности бактерий с иммуномодулирующим потенциалом, а именно представителей родов *Bifidobacterium*, *Lachnospira*, *Roseburia*, *Coprococcus* и *Prevotella*, являющихся, как известно, продуцентами короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) бутирата и пропионата. Понижение содержания последних сопровождается активацией гистондеацетилазы и ингибированием G-белковых рецепторов GPR41, GPR43 и GPR109A, и, как следствие — развитием хронического воспаления [40]. В то же время нами обнаружена повышенная представленность потенциальных патобионтов, а именно бактерий рода *Ruminococcus* и *Klebsiella*. Представленные нами результаты отчасти согласуются с данными других авторов. Так, для женщин с ИПВ было характерно снижение представленности бактерий *Prevotella*, *Roseburia*, *Lachnospira* и повышение представленности бактерий *Ruminococcus*, *Klebsiella* [32]. В других работах показано снижение численности *Lachnospira*, *Roseburia*, *Prevotella* [33] и снижение представленности *Prevotella* [31]. Противоречивость данных во многом может определяться тем фактом, что работы выполняли в разных географических областях, а также различиями в методологии включения обследованных в исследование. Мы не включали в настоящее исследование женщин с отягощенным гинекологическим анамнезом и коморбидной экстрагенитальной патологией, а также принимавших пробиотики, пребиотики, симбиотические средства в предшествующие три месяца до проведения исследования, чтобы исключить их влияние на результаты исследования. Также важно отметить малый размер выборки в ранее описанных исследованиях [32, 33].

Как уже указывалось, у женщин с ИПВ обнаруживаются в крови высокие концентрации кортизола, TNF α , IL17 и снижение концентрации мелатонина, роль которых в патогенезе ИПВ подтверждена [13, 11, 23, 24]. Полученные нами результаты сопоставимы с данными литературы: у женщин с ИПВ в сравнении с женщинами с физиологически протекающей беременностью зафиксированы статистически значимые различия по плазменным концентрациям кортизола, мелатонина, TNF α и IL17. Принципиально, что некоторые представители микробиоты кишечника у женщин с ИПВ сопряжены с плазменными концентрациями исследованных биомаркеров; этот факт может указывать на существование связи между составом, численностью микробиоты кишечника и ИПВ. Отрицательный характер корреляции с плазменной концентрацией кортизола был показан для рода *Lachnospira*, что свидетельствует о возможном активном участии этих бактерий в нарушении регуляции активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) при ИПВ. Мы не обнаружили работ, в которых бы изучали связь между микробиотой кишечника и кортизолом у женщин с ИПВ. Вместе с тем показано, что

у больных с синдромом Кушинга *Lachnospira* отрицательно коррелировала с экспрессией кортизола [41]. Подобная закономерность представлена в другом исследовании: сокращение представленности бактерий *Lachnospira* было тесно ассоциировано с более высокой концентрацией кортизола у здоровых детей в возрасте 8–16 лет [42]. В литературе нами была найдена вероятная интерпретация этой корреляции. Известно, что *Lachnospira* является одной из основных бактерий, продуцирующих бутират. Поскольку КЦЖК способны пересекать гематоэнцефалический барьер (через циркумвентрикулярные структуры), можно обсуждать их участие в модуляции активности ГГНО путем непосредственного влияния на секреторный тонус в гипофизарных нейронах медиального паравентрикулярного ядра [43]. Указания на то, что КЦЖК обладают способностью воздействовать на экспрессию, кортизола были получены в экспериментальных и клинических исследованиях. Так, показано, что применение КЦЖК (67,5 мМ ацетата + 25 мМ пропионата + 25 мМ бутирата) на протяжении семи дней у мышей сопровождалось ингибированием потенцированной острым стрессом секреции кортикостерона [44]. В свою очередь семидневное введение физиологических доз КЦЖК непосредственно в толстую кишку обеспечивало увеличение их концентрации в системном кровотоке и ослабление интенсивности реакции кортизола на острый психо-социальный стресс у здоровых лиц [45].

Обнаружена корреляция показателя мелатонина с представленностью бактерий *Coprococcus*, что может быть опосредовано блокировкой сигналов в системе p-CREB-связывающего белка — арилалкиламин-N-ацетилтрансферазы за счет ингибирования триптофана [46], являющегося предшественником серотонина, из которого в последующем синтезируется мелатонин. В литературе описаны схожие ассоциации у больных ювенильным идиопатическим артритом [47] и сахарным диабетом 2-го типа [48], что подтверждалось прямыми тесными корреляциями представленности *Coprococcus* с уровнями метаболитов триптофана [48] и плазменного мелатонина [47, 48].

Обсуждая полученные нами результаты в отношении связи микробиоты кишечника с показателями в крови TNF α и IL17 в группе женщин с ИПВ, важно отметить, что только некоторые из них согласуются с данными литературы. Ранее уже была оценена взаимосвязь между микробиотой кишечника и провоспалительными цитокинами [33]. Было выявлено, что у пациенток с ИПВ уменьшение бактериального разнообразия ассоциировалось с повышением в крови концентрации TNF α и IL17 [33]. Полученные нами данные также не противоречат результатам приведенных исследований. Этот факт может указывать на то, что у пациенток с ИПВ провоспалительные эффекты микробиома, вероятно, вызваны целостным дисбиозом кишечника. Кроме того, в своем исследовании мы обнаружили прямую связь между уровнем в крови TNF α и представленностью *Ruminococcus*. Как известно, бактерии *Ruminococcus* синтезируют воспалительный липополисахарид глюкорамнан, который посредством активации TLR4-опосредованных реакций индуцирует выработку дендритными клетками костного мозга провоспалительных цитокинов, включая TNF α [49]. К настоящему времени накоплен достаточный пул исследований, указывающих на то, что *Bifidobacterium* способны влиять на выраженность воспалительных реакций [50–54]. Так, снижение численности *Bifidobacterium* сопряжено с развитием преэклампсии [51], сокращением сроков жизни аллотрансплантата

сердца [50] повышенным риском развития аутоиммунных состояний [52] и воспалительных заболеваний кишечника [53]. Как известно, снижение представленности бактерий рода *Bifidobacterium* сопряжено с активацией ацетилирования гистонов и подавлением метилирования ДНК, что, в свою очередь, приводит к усилению активации транскрипции, опосредованной NF-κB и интенсификации экспрессии IL17 [50]. Отрицательная корреляция между концентрацией в крови IL17 и численностью *Bifidobacterium*, обнаруженная в нашем исследовании, является дополнительным доказательством этой ассоциации. Вместе с тем, полученные нами результаты не согласуются с данными исследования [33], в котором была установлена отрицательная связь между концентрацией в крови IL17 и представленностью *Prevotella* у женщин с ИПВ. Несогласованность полученных нами результатов с данными сопоставляемой работы, как указывалось ранее, скорее всего, является следствием различий в дизайне исследования, а именно, включением женщин с ИПВ без гинекологической патологии и метаболических нарушений. В то время как в исследовании [33] наличие синдрома поликистозных яичников и инсулинорезистентности у участниц не являлись факторами исключения. Этот

факт мог повлиять на отличия ассоциаций TNFα и IL17 с представителями микробиоты кишечника у женщин с ИПВ от имеющихся в литературе. Тем не менее, ранее опубликованные данные [33] и результаты настоящего исследования позволяют предположить значимую роль микробиоты кишечника в иммуногенезе ИПВ. По-видимому, причинно-следственные связи между микробиотой кишечника и уровнем провоспалительных цитокинов в крови при ИПВ требуют более детальной проработки и продолжения исследований в этом направлении.

ВЫВОДЫ

У женщин с ИПВ установлены выраженные нарушения представленности и таксономического состава микробиоты кишечника. Обнаруженные статистически значимые корреляционные связи между некоторыми представителями микробиоты и гормональными и воспалительными маркерами подтверждают постулат о сопряженности представленности и состава микробиоты кишечника с ИПВ. Коррекция микробиоты кишечника может иметь потенциальную профилактическую и терапевтическую значимость для женщин с ИПВ.

Литература

1. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013; 99 (1): 63.
2. El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, et al. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Women's Health*. 2017; 9: 31–45.
3. Lund M, Kamper-Jørgensen M, Nielsen HS, et al. Prognosis for live birth in women with recurrent miscarriage: what is the best measure of success? *Obstet Gynecol*. 2012; 119 (1): 37–43.
4. Jevcic YB, Davies W. Evidence-based management of recurrent miscarriages. *J Hum Reprod Sci*. 2014; 7: 159–69.
5. Abu-Heija A. Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss: Is heparin still the drug of choice? *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2014; 14 (1): e26–36.
6. Zejnnullahu VA, Zejnnullahu VA, Kosumi E. The role of oxidative stress in patients with recurrent pregnancy loss: a review. *Reprod Health*. 2021; 16; 18 (1): 207.
7. Kniolek M, Zych M, Roszczyk A, et al. Decreased Production of TNFα and IL6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL Women. *J Clin Med*. 2021; 15; 10 (14): 3115.
8. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17 (8): 469–82.
9. Yang X, Tian Y, Zheng L, et al. The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. *Int J Mol Sci*. 2023; 21; 24 (1): 132.
10. Dai FF, Hu M, Zhang YW, et al. TNFα/anti-TNFα drugs and its effect on pregnancy outcomes. *Expert Rev Mol Med*. 2022; 10: 24–26.
11. Saifi B, Rezaee SA, Tajik N, et al. Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window. *Reprod Biomed Online*. 2014; 29: 481–9.
12. Piccinni MP, Raghupathy R, Saito S, Szekeres-Bartho J. Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. *Front Immunol*. 2021; 28; 12: 717808.
13. Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997; 76: 205–11.
14. Kilani RT, Mackova M, Davidge ST et al. Endogenous tumor necrosis factor — mediates enhanced apoptosis of cultured villous trophoblasts from intrauterine growth-restricted placentae. *Reproduction*. 2007; 133: 257–64.
15. Salama KM, Alloush MK, Hussini RM. Are the cytokines TNF alpha and IL 1Beta early predictors of embryo implantation? Cross sectional study. *J Reprod Immunol*. 2020; 137: 102618.
16. Azizieh FY, Raghupathy RG. Tumor necrosis factor-α and pregnancy complications: a prospective study. *Med Princ Pract*. 2015; 24 (2): 165–70.
17. Zhang Y, Zhang Y, Li H, et al. NOD1 modulates decidual stromal cell function to maintain pregnancy in the early trimester. *Cell Biochemistry and Function* 2019; 37: 464–73.
18. Yang SL, Tan HX, Niu TT, et al. Kynurenine promotes the cytotoxicity of NK cells through aryl hydrocarbon receptor in early pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2021; 143: 103270.
19. Najafi S, Hadinedoushan H, Eslami G, Aflatoonian A. Association of IL17A and IL17 F gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31 (11): 1491–6.
20. Buzzaccarini G, Vitagliano A, Andrisani A, et al. Chronic Endometritis and Altered Embryo Implantation: A Unified Pathophysiological Theory from a Literature Systematic Review. *J Assist Reprod Genet*. 2020; 37: 2897–2911.
21. Lee SK, Kim JY, Lee M, et al. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67: 311–8.
22. Sha J, Liu F, Zhai J, et al. Alteration of Th17 and Foxp3+regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after the therapy of hCG combined with immunoglobulin. *Exp Ther Med*. 2017; 14: 1114–8.
23. McCarthy R, Jungheim ES, Fay JC, et al. Riding the rhythm of melatonin through pregnancy to deliver on time. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 13 (10): 616.
24. Nepomnaschy PA, Welch KB, McConnell DS, et al. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 3938–42.
25. Palmer KT, Bonzini M, Harris EC, et al. Europe PMC Funders Group Work activities and risk of prematurity, low birthweight and preeclampsia: an updated review with meta-analysis. *Occup Environ Med*. 2013; 70: 213–22.

26. Kisanga EP, Tang Z, Guller S, Whirlledge S. Glucocorticoid signaling regulates cell invasion and migration in the human first-trimester trophoblast cell line Sw.71. *Am J Reprod Immunol*. 2018; 80: e12974.
27. Húngaro TGR, Gregnani MF, Alves-Silva T, et al. Cortisol dose-dependently impairs migration and tube-like formation in a trophoblast cell line and modulates inflammatory and angiogenic genes. *Biomedicines*. 2021; 9 (8): 980.
28. Michael AE, Papageorghiou AT. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2008; 14 (5): 497–517.
29. Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E. The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system, annals of the new. 1997; 17 (816): 42–56.
30. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. The pineal gland and spontaneous abortions: Implications for therapy with melatonin and magnetic field. *Int J Neurosci*. 1992; 62 (3–4): 243–50.
31. Jin M, Li D, Ji R, et al. Changes in Gut Microorganism in Patients with Positive Immune Antibody-Associated Recurrent Abortion. *Biomed Res Int*. 2020; 18: 4673250.
32. Cui Y, Zou L, Ye Q, et al. Gut microbiota composition and functional prediction in recurrent spontaneous abortion. *Research Square*; 2021.
33. Liu Y, Chen H, Feng L, Zhang J. Interactions between gut microbiota and metabolites modulate cytokine network imbalances in women with unexplained miscarriage. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2021; 17; 7 (1): 24.
34. ESHRE Guideline Group on RPL. Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. *Hum Reprod Open*. 2023; 2023 (1): hoad002.
35. Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013; 14 (5): 16.
36. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
37. 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.
38. 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.
39. Guang Y, Shen X, Tan Y, et al. Systematic analysis of microbiota in pregnant Chinese women and its association with miscarriage. *Ann Transl Med*. 2022; 10 (20): 1099.
40. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients*. 2011; 3 (10): 858–76.
41. Zhang Q, Hu WM, Deng YL, et al. Dysbiosis of gut microbiota and decreased propionic acid associated with metabolic abnormality in Cushing's syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023; 13: 1095438.
42. Michels N, Van de Wiele T, Fouhy F, et al. Gut microbiome patterns depending on children's psychosocial stress: Reports versus biomarkers. *Brain Behav Immun*. 2019; 80: 751–62.
43. Ziegler DR, Herman JP. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. *Integr Comp Biol*. 2002; 42: 541–51.
44. Van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J Appl Physiol*. 2018; 596: 4923–44.
45. Daille B, Vervliet B, Bergonzelli G, et al. Colon-delivered shortchain fatty acids attenuate the cortisol response to psychosocial stress in healthy men: a randomized, placebo-controlled trial. *Neuropsychopharmacol*. 2020; 45: 2257–66.
46. Song L, He M, Sun Q, et al. Roseburia hominis Increases Intestinal Melatonin Level by Activating p-CREB-AANAT Pathway. *Nutrients*. 2022; 14: 117.
47. Поросяк М. В., Клементьев Д. Д., Ходов Н. А., и др. Изменения микробиоты кишечника у больных ювенильным идиопатическим артритом. *Вестник РГМУ*. 2022; (6): 13–9.
48. Huang X, Qiu Y, Gao Y, et al. Gut microbiota mediate melatonin signalling in association with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2022; 65 (10): 1627–41.
49. Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, et al. Ruminococcus gnavus, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci*. 2019; 116: 12672–7.
50. Bromberg JS, Hittle L, Xiong Y, et al. Gut microbiota-dependent modulation of innate immunity and lymph node remodeling affects cardiac allograft outcomes. *JCI Insight [Internet]*. 2018; 3 (19): e121045.
51. Miao T, Yu Y, Sun J, et al. Decrease in abundance of bacteria of the genus Bifidobacterium in gut microbiota may be related to pre-eclampsia progression in women from East China. *Food Nutr Res*. 2021; 28; 65.
52. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, et al. DIABIMMUNE Study Group Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans. *Cell*. 2016; 165: 842–53.
53. Henrick BM, Chew S, Casaburi G, et al. Colonization by B. infantis EVC001 modulates enteric inflammation in exclusively breastfed infants. *Pediatr Res*. 2019; 86: 749–57.
54. Feng Y, Duan Y, Xu Z, et al. An examination of data from the American Gut Project reveals that the dominance of the genus Bifidobacterium is associated with the diversity and robustness of the gut microbiota. *Microbiologyopen*. 2019; 8 (12): e939.

References

1. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013; 99 (1): 63.
2. El Hachem H, Crepau V, May-Panloup P, et al. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Women's Health*. 2017; 9: 31–45.
3. Lund M, Kamper-Jørgensen M, Nielsen HS, et al. Prognosis for live birth in women with recurrent miscarriage: what is the best measure of success? *Obstet Gynecol*. 2012; 119 (1): 37–43.
4. Jevc YB, Davies W. Evidence-based management of recurrent miscarriages. *J Hum Reprod Sci*. 2014; 7: 159–69.
5. Abu-Hejja A. Thrombophilia and Recurrent Pregnancy Loss: Is heparin still the drug of choice? *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2014; 14 (1): e26–36.
6. Zejnnullahu VA, Zejnnullahu VA, Kosumi E. The role of oxidative stress in patients with recurrent pregnancy loss: a review. *Reprod Health*. 2021; 16; 18 (1): 207.
7. Kniotek M, Zych M, Roszczyk A, et al. Decreased Production of TNF α and IL6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL Women. *J Clin Med*. 2021; 15; 10 (14): 3115.
8. Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17 (8): 469–82.
9. Yang X, Tian Y, Zheng L, et al. The Update Immune-Regulatory Role of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses. *Int J Mol Sci*. 2023; 21; 24 (1): 132.
10. Dai FF, Hu M, Zhang YW, et al. TNF α /anti-TNF α drugs and its effect on pregnancy outcomes. *Expert Rev Mol Med*. 2022; 10: 24–26.
11. Saifi B, Rezaee SA, Tajik N, et al. Th17 cells and related cytokines in unexplained recurrent spontaneous miscarriage at the implantation window. *Reprod Biomed Online*. 2014; 29: 481–9.
12. Piccinni MP, Raghupathy R, Saito S, Szekeres-Bartho J. Cytokines, Hormones and Cellular Regulatory Mechanisms Favoring Successful Reproduction. *Front Immunol*. 2021; 28; 12: 717808.
13. Shaarawy M, Nagui AR. Enhanced expression of cytokines may play a fundamental role in the mechanisms of immunologically mediated recurrent spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol*

- Scand. 1997; 76: 205–11.
14. Kilani RT, Mackova M, Davidge ST et al. Endogenous tumor necrosis factor — mediates enhanced apoptosis of cultured villous trophoblasts from intrauterine growth-restricted placentae. *Reproduction*. 2007; 133: 257–64.
 15. Salama KM, Alloush MK, Hussini RM. Are the cytokines TNF alpha and IL 1Beta early predictors of embryo implantation? Cross sectional study. *J Reprod Immunol*. 2020; 137: 102618.
 16. Azizieh FY, Raghupathy RG. Tumor necrosis factor- α and pregnancy complications: a prospective study. *Med Princ Pract*. 2015; 24 (2): 165–70.
 17. Zhang Y, Zhang Y, Li H, et al. NOD1 modulates decidual stromal cell function to maintain pregnancy in the early trimester. *Cell Biochemistry and Function* 2019; 37: 464–73.
 18. Yang SL, Tan HX, Niu TT, et al. Kynurenine promotes the cytotoxicity of NK cells through aryl hydrocarbon receptor in early pregnancy. *J Reprod Immunol*. 2021; 143: 103270.
 19. Najafi S, Hadinedoushan H, Eslami G, Aflatoonian A. Association of IL17A and IL17 F gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J Assist Reprod Genet*. 2014; 31 (11): 1491–6.
 20. Buzzaccarini G, Vitagliano A, Andrisani A, et al. Chronic Endometritis and Altered Embryo Implantation: A Unified Pathophysiological Theory from a Literature Systematic Review. *J Assist Reprod Genet*. 2020; 37: 2897–2911.
 21. Lee SK, Kim JY, Lee M, et al. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67: 311–8.
 22. Sha J, Liu F, Zhai J, et al. Alteration of Th17 and Foxp3+regulatory T cells in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion before and after the therapy of hCG combined with immunoglobulin. *Exp Ther Med*. 2017; 14: 1114–8.
 23. McCarthy R, Jungheim ES, Fay JC, et al. Riding the rhythm of melatonin through pregnancy to deliver on time. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019; 13 (10): 616.
 24. Nepomnaschy PA, Welch KB, McConnell DS. et al. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 3938–42.
 25. Palmer KT, Bonzini M, Harris EC, et al. Europe PMC Funders Group Work activities and risk of prematurity, low birthweight and preeclampsia: an updated review with meta-analysis. *Occup Environ Med*. 2013; 70: 213–22.
 26. Kisanga EP, Tang Z, Guller S, Whirlledge S. Glucocorticoid signaling regulates cell invasion and migration in the human first-trimester trophoblast cell line Sw.71. *Am J Reprod Immunol*. 2018; 80: e12974.
 27. Húngaro TGR, Gregnani MF, Alves-Silva T, et al. Cortisol dose-dependently impairs migration and tube-like formation in a trophoblast cell line and modulates inflammatory and angiogenic genes. *Biomedicines*. 2021; 9 (8): 980.
 28. Michael AE, Papageorghiou AT. Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2008; 14 (5): 497–517.
 29. Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E. The Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system, annals of the new. 1997; 17 (816): 42–56.
 30. Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA, Tsagas N. The pineal gland and spontaneous abortions: Implications for therapy with melatonin and magnetic field. *Int J Neurosci*. 1992; 62 (3–4): 243–50.
 31. Jin M, Li D, Ji R, et al. Changes in Gut Microorganism in Patients with Positive Immune Antibody-Associated Recurrent Abortion. *Biomed Res Int*. 2020; 18: 4673250.
 32. Cui Y, Zou L, Ye Q, et al. Gut microbiota composition and functional prediction in recurrent spontaneous abortion. *Research Square*; 2021.
 33. Liu Y, Chen H, Feng L, Zhang J. Interactions between gut microbiota and metabolites modulate cytokine network imbalances in women with unexplained miscarriage. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2021; 17; 7 (1): 24.
 34. ESHRE Guideline Group on RPL. Bender Atik R, Christiansen OB, Elson J, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022. *Hum Reprod Open*. 2023; 2023 (1): hoad002.
 35. Mitra S, Forster-Fromme K, Damms-Machado A, et al. Analysis of the intestinal microbiota using SOLiD16S rRNA gene sequencing and SOLiD shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 2013; 14 (5): 16.
 36. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7 (5): 335–6.
 37. 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.
 38. Ritari J, Salojärvi J, Lahti I, de Vos WM. Improved taxonomic assignment of human intestinal 16S rRNA sequences by a dedicated reference database. *BMC Genomics*. 2015; 16 (1): 1056.
 39. Guang Y, Shen X, Tan Y, et al. Systematic analysis of microbiota in pregnant Chinese women and its association with miscarriage. *Ann Transl Med*. 2022; 10 (20): 1099.
 40. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. *Nutrients*. 2011; 3 (10): 858–76.
 41. Zhang Q, Hu WM, Deng YL, et al. Dysbiosis of gut microbiota and decreased propionic acid associated with metabolic abnormality in Cushing's syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023; 13: 1095438.
 42. Michels N, Van de Wiele T, Fouhy F, et al. Gut microbiome patterns depending on children's psychosocial stress: Reports versus biomarkers. *Brain Behav Immun*. 2019; 80: 751–62.
 43. Ziegler DR, Herman JP. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat1. *Integr Comp Biol*. 2002; 42: 541–51.
 44. Van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J Appl Physiol*. 2018; 596: 4923–44.
 45. Dalile B, Vervliet B, Bergonzelli G, et al. Colon-delivered shortchain fatty acids attenuate the cortisol response to psychosocial stress in healthy men: a randomized, placebo-controlled trial. *Neuropsychopharmacol*. 2020; 45: 2257–66.
 46. Song L, He M, Sun Q, et al. Roseburia hominis Increases Intestinal Melatonin Level by Activating p-CREB-AANAT Pathway. *Nutrients*. 2022; 14: 117.
 47. Porosjuk MV, Klementev DD, Hodov NA, i dr. Izmeneniya mikrobioty kishhechnika u bol'nyh juvenil'nykh idiopatcheskim artritom. *Vestnik RGMU*. 2022; (6): 13–9. Russian.
 48. Huang X, Qiu Y, Gao Y, et al. Gut microbiota mediate melatonin signalling in association with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2022; 65 (10): 1627–41.
 49. Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, et al. Ruminococcus gnavus, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci*. 2019; 116: 12672–7.
 50. Bromberg JS, Hittle L, Xiong Y, et al. Gut microbiota-dependent modulation of innate immunity and lymph node remodeling affects cardiac allograft outcomes. *JCI Insight [Internet]*. 2018; 3 (19): e121045.
 51. Miao T, Yu Y, Sun J, et al. Decrease in abundance of bacteria of the genus Bifidobacterium in gut microbiota may be related to pre-eclampsia progression in women from East China. *Food Nutr Res*. 2021; 28: 65.
 52. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, et al. DIABIMMUNE Study Group Variation in microbiome LPS immunogenicity contributes to autoimmunity in humans *Cell*. 2016; 165: 842–53.
 53. Henrick BM, Chew S, Casaburi G, et al. Colonization by B. infantis EVC001 modulates enteric inflammation in exclusively breastfed infants *Pediatr. Res*. 2019; 86: 749–57.
 54. Feng Y, Duan Y, Xu Z, et al. An examination of data from the American Gut Project reveals that the dominance of the genus Bifidobacterium is associated with the diversity and robustness of the gut microbiota. *Microbiologyopen*. 2019; 8 (12): e939.

ОЦЕНКА КЛИНИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НОВОГО СПОСОБА АДАПТИВНОГО УПРАВЛЕНИЯ ИНФУЗИЕЙ ПРИ ФАКОЭМУЛЬСИФИКАЦИИ

Б. М. Азнабаев^{1,2}, Т. Р. Мухамадеев^{1,2}, Т. Н. Исмагилов^{1,2}✉, Т. И. Дибаяев^{1,2}

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

² Закрытое акционерное общество «Оптимерсвис», Уфа, Россия

Важной задачей для обеспечения безопасности факоемульсификации (ФЭК) является снижение негативных воздействий на внутриглазные структуры интраоперационных колебаний внутриглазного давления — постокклюзионных волн (ПОВ). В связи с этим был разработан новый способ управления инфузией при ФЭК, основанный на контроле скорости инфузионного и аспирационного потоков в совокупности с мониторингом параметров вакуума. Целью исследования было дать сравнительную оценку клинико-функциональных показателей глаз пациентов после ФЭК с применением нового и существующего способов адаптивного управления инфузией. По поводу катаракты были прооперированы 38 пациентов в возрасте $66,4 \pm 7,8$ года (15 мужчин и 23 женщины) в основной группе (система Оптимед Профи с применением нового способа), 35 пациентов в возрасте $68,7 \pm 7,5$ года (16 мужчин и 19 женщин) в контрольной группе (система Centurion Vision System с функцией Active Fluidics). До операции, а также на 1-е, 7-е, 30-е сутки, на 3-й и 6-й месяцы после операции пациентам проводили комплексное офтальмологическое обследование. У пациентов основной группы с III и IV степенью плотности катаракты отмечена меньшая потеря эндотелиальных клеток роговицы на 3-й и 6-й месяцы после операции ($p < 0,05$). По результатам сравнения параметров микроциркуляции макулярной области, в основной группе к 6-му месяцу послеоперационного наблюдения отмечено снижение площади ФАЗ, а также увеличение общей плотности сосудов глубокой сосудистой сети ($p < 0,001$). В контрольной группе, к 6-му месяцу послеоперационного наблюдения отмечено статистически значимое снижение общей плотности поверхностного и глубокого сосудистых сплетений ($p < 0,05$). Использование нового способа адаптивного управления инфузией способствует эффективному выполнению факоемульсификации катаракт различной плотности с меньшим процентом потери эндотелиальных клеток роговицы в отдаленном послеоперационном периоде.

Ключевые слова: факоемульсификация, постокклюзионная волна, внутриглазное давление, эндотелий роговицы, глазное перфузионное давление, оптическая когерентная томография

Вклад авторов: Б. М. Азнабаев — разработка концепции, утверждение окончательного варианта статьи; Т. Р. Мухамадеев — разработка концепции, редактирование текста; Т. Н. Исмагилов — проведение исследования, подготовка и редактирование текста; Т. И. Дибаяев — подготовка и редактирование текста.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Башкирского государственного медицинского университета (протокол № 10 от 15 декабря 2021 г.). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на хирургическое лечение и обработку персональных данных.

✉ **Для корреспонденции:** Тимур Наилевич Исмагилов
ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, 450008, Россия; ismagilov-timur@bk.ru

Статья получена: 19.01.2024 **Статья принята к печати:** 10.02.2024 **Опубликована онлайн:** 28.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.009

ASSESSING CLINICAL EFFICACY OF NEW METHOD FOR ADAPTIVE INFUSION CONTROL IN PHACOEMULSIFICATION

Aznabaev BM^{1,2}, Mukhamadeev TR^{1,2}, Ismagilov TN^{1,2}✉, Dibaev TI^{1,2}

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

² ZAO "Optimerservis", Ufa, Russia

Reduction of the adverse effects of intraoperative intraocular pressure fluctuation referred to as post-occlusion surge on the intraocular structures is an important task for ensuring phacoemulsification safety. In this regard, the method to control infusion during phacoemulsification based on controlling the infusion and aspiration flow rates in combination with monitoring of vacuum parameters was developed. The study was aimed to provide comparative assessment of clinical and functional characteristics of the eye in patients after phacoemulsification using the new and already existing adaptive infusion control methods. A total of 38 patients aged 66.4 ± 7.8 years (15 males and 23 females) in the index group (Optimed Profi system with the use of new method) and 35 patients aged 68.7 ± 7.5 years (16 males and 19 females) in the control group (Centurion Vision System with Active Fluidics) underwent surgery due to cataract. The patients underwent comprehensive eye examination before surgery and on days 1, 7, 30, months 3, 6 after surgery. The smaller loss of corneal endothelial cells on months 3 and 6 after surgery was observed in patients of the index group with grade III and IV cataract ($p < 0.05$). Comparison of macular microcirculation parameters revealed the reduced FAZ area by month 6 of postoperative follow-up in the index group, along with the increased total vascular density of the deep vasculature ($p < 0.001$). A significant decrease in the total density of the superficial and deep vascular plexuses by month 6 of postoperative follow-up was observed in the control group ($p < 0.05$). The use of new adaptive infusion control method contributes to effective phacoemulsification of cataracts of varying density with the lower percentage of the corneal endothelial cells lost in the late postoperative period.

Keywords: phacoemulsification, postocclusion surge, intraocular pressure, corneal endothelium, ocular perfusion pressure, optical coherence tomography

Author contribution: Aznabaev BM — developing the concept, approving final version of the article; Mukhamadeev TR — developing the concept, manuscript editing; Ismagilov TN — research procedure, manuscript writing and editing; Dibaev TI — manuscript writing and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Bashkir State Medical University (protocol № 10 dated 15 December 2021). All patients submitted the informed consent to surgical treatment and personal data processing.

✉ **Correspondence should be addressed:** Timur N. Ismagilov
Lenina, 3, Ufa, 450008, Russia; ismagilov-timur@bk.ru

Received: 19.01.2024 **Accepted:** 10.02.2024 **Published online:** 28.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.009

Наиболее распространенным методом хирургического лечения катаракты во всем мире является факоэмульсификация (ФЭК) — операция, при которой хрусталик фрагментируют и эмульсифицируют под действием ультразвука, после чего имплантируют интраокулярную линзу (ИОЛ) [1–3].

Основными тенденциями катарактальной хирургии в настоящее время считают снижение интраоперационной травмы и инвазивности операционного вмешательства. Ведущей задачей по обеспечению безопасности факоэмульсификации является снижение повреждающих воздействий на внутриглазные структуры колебаний внутриглазного давления вследствие нарушения баланса между притоком и оттоком жидкости из передней камеры глаза (постокклюзионные волны) [4–8].

Один из ведущих способов противодействия ПОВ — управление инфузионной составляющей хирургической системы. Подача инфузионной жидкости — неотъемлемый компонент в катарактальной хирургии, за счет которого поддерживается стабильность передней камеры [9–11]. Эффективное управление инфузией невозможно без непрерывного мониторинга гидродинамических параметров системы (уровня вакуума аспирационной линии, скорости перистальтического аспирационного насоса, давления в инфузионной магистрали) [12–17]. С этой целью в современных хирургических системах реализованы способы адаптивного управления инфузионным потоком, которые корректируют инфузионное давление под изменяющиеся гидродинамические условия операции. Несмотря на существующие методы по обеспечению гидродинамической стабильности ФЭК, проблема возникновения ПОВ наблюдается даже при операциях на современных хирургических системах, в большинстве из которых используют способы адаптивного управления инфузионным потоком [18–20].

При управлении инфузией большого внимания требует достоверная и быстрая оценка проходимости факоиглы при различных гидродинамических состояниях. Важной стороной проблемы является своевременная дифференциация хирургической системой гидродинамических состояний, следующих друг за другом — состояния окклюзии факоиглы, а также состояний прорыва окклюзии и проходимой факоиглы.

Решением вопроса достоверной оценки проходимости факоиглы может стать бесконтактный контроль скорости потоков в магистралях системы, так как скорость потока перманентна на всем протяжении трубки. Кроме того, совместный контроль скорости жидкости в инфузионной и аспирационной магистрали позволит выявить малейшие флуктуации потока, которые могут быть предвестниками прорыва окклюзии.

На базе хирургической системы «Оптимед Профи» (РУ № ФСР 2011/11396 от 11.11.2013) сотрудниками кафедры офтальмологии БГМУ совместно с инженерами отдела микрохирургического оборудования ЗАО «Оптимедсервис» разработан новый способ адаптивного управления инфузией при ФЭК (Патент РФ на изобретение № 2788289 от 17.01.2023). Изобретенный способ позволяет уменьшить интраоперационные колебания внутриглазного давления (постокклюзионных волн) за счет рационального управления инфузионным потоком в зависимости от значений параметров скорости аспирационного и инфузионного потоков, а также уровня вакуума в аспирационной линии [21, 22]. Актуальна сравнительная оценка клинико-функциональных

показателей у пациентов с возрастной катарактой, прооперированных методом ФЭК с использованием нового способа адаптивного управления инфузией на базе системы «Оптимед Профи» и существующего способа управления инфузией на базе системы Centurion Vision System (Alcon; США).

Цель исследования — сравнительная оценка клинико-функциональных показателей глаз пациентов после ФЭК с применением нового и существующего способов адаптивного управления инфузией.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Критерии включения пациентов в исследование: наличие возрастной катаракты с I–IV степенью плотности ядра хрусталика с количеством эндотелиальных клеток роговицы более 1500 кл/мм²; отсутствие дистрофических изменений роговицы и перенесенных офтальмологических операций в анамнезе. Пациенты были прооперированы на базе кафедры офтальмологии ФГБОУ ВО БГМУ — в центре лазерного восстановления зрения Optimed (г. Уфа). В основной группе пациентов ($n = 38$) факоэмульсификацию проводили на хирургической системе «Оптимед Профи» с применением нового способа адаптивного управления инфузией. В контрольной группе пациентов ($n = 35$) операции выполняли на хирургической системе Centurion Vision System с функцией Active Fluidics.

Принципиальным отличием нового способа адаптивного управления инфузией при ФЭК от существующего являются оценка проходимости факоиглы и управление инфузионным давлением не на основании контроля инфузионного давления, которое может иметь вариабельность в различных участках магистрали, а с помощью комплексного мониторинга скорости инфузионного и аспирационного потока, которые перманентны на протяжении всей магистрали. Третьим контролируемым параметром является уровень вакуума в аспирационной магистрали.

Алгоритм работы способа включает идентификацию как минимум трех гидродинамических состояний на основании характерных изменений параметров скорости инфузионного и аспирационного потоков и уровня вакуума в аспирационной линии: «проходимая факоигла», «окклюзия факоиглы» и «прорыв окклюзии»; при этом инфузионная компенсация постокклюзионных волн происходит одновременно с идентификацией состояния «прорыв окклюзии».

Преимуществом разработанного способа является обеспечение адаптивного управления инфузией, которое позволяет повысить точность и достоверность определения гидродинамических состояний, связанных с проходимость факоиглы во время факоэмульсификации, а также уменьшить интраоперационные колебания ВГД, связанные с постокклюзионными волнами.

При наборе пациентов тщательно формировались клинические группы, что определялось необходимостью создания идентичных условий для оценки клинико-функциональных результатов операции. Для формирования сопоставимых групп исследования учитывались: плотность ядра хрусталика (по общепринятой классификации Буратто), особенности коморбидного фона, а также половой и возрастной состав [23].

Критерии невключения в исследование: наличие осложнений и травматических катаракт; плотность катаракты V степени по классификации Буратто;

Таблица 1. Настройки хирургических систем в основной и контрольной группах исследования

Параметр	Группы	
	Основная (n = 38) «Оптимед Профи»	Контрольная (n = 35) Centurion Vision System
Предел вакуума, мм рт. ст.	400	400
Производительность аспирации, мл/мин	35	35
Режим аспирации	Фиксированный	Фиксированный
Целевое ВГД, мм рт. ст.	45	45
Форма ультразвуковых колебаний	Трехмерные	Торсионные + продольные
Мощность ультразвука, %	0–80	0–80
Режим ультразвука	Гиперпульс	Гиперпульс
Калибр факоиглы	21G	21G
Внутренний диаметр аспирационной и инфузионной линии, мм	1,3 / 3,25	1,3 / 3,25

псевдоэксфолиативный синдром; сопутствующая офтальмологическая патология, в том числе аметропия высокой степени; диабетическая ретинопатия и другие тяжелые соматические заболевания.

Пациентам обеих групп проводили комплексное офтальмологическое исследование, включавшее определение максимально скорректированной остроты зрения (МКОЗ) по десятичной системе, биомикроскопию, подсчет потери эндотелиальных клеток роговицы с помощью эндотелиального микроскопа EM-3000 (Tomey; Япония). С целью анализа сосудистой плотности поверхностного и глубокого сосудистых сплетений в парафовеа и перифовеа и подсчета площади фовеальной аваскулярной зоны (ФАЗ), в каждой группе исследования 25 пациентам проводили оптическую когерентную томографию с функцией ангиографии (ОКТА) на томографе Avanti XR (Optovue; США).

Кроме того, до операции и во все сроки после нее у пациентов обеих групп оценивали среднее глазное перфузионное давление (СГПД) по следующей формуле:

$$\text{СГПД} = 2/3 \text{ СрАД} - \text{ВГД},$$

где СрАД (среднее артериальное давление) = $1/3$ САД (систолическое артериальное давление) + $2/3$ ДАД (диастолическое артериальное давление), ВГД — внутриглазное давление [24].

Все операции проводили под местной анестезией в амбулаторных условиях. Настройки хирургических систем представлены в табл. 1.

Внутренний диаметр трубок аспирационной и инфузионной магистралей был идентичен в обеих группах — 1,3 и 3,25 мм соответственно. Операции выполняли на уровне целевого ВГД — 45 мм рт. ст., согласно рекомендациям в мировом сообществе катарактальных хирургов, по данным которых оптимальный диапазон целевого ВГД с точки зрения эффективности и безопасности ФЭК составляет 45–60 мм рт. ст. [25–27].

После выполнения роговичных разрезов и окрашивания передней капсулы хрусталика выполняли круговой капсулорексис. По завершении этапа гидродиссекции и гидроделинеации начинали этап разлома и фрагментации ядра хрусталика. Мощность ультразвука устанавливали индивидуально в зависимости от степени плотности катаракты. Как правило, при удалении ядер I степени плотности устанавливаемая мощность ультразвука не

превышала 20%. При удалении ядер II степени плотности применяли мощность 20–35%, III степени плотности — 40–50%, IV степени плотности — 50% и выше. Применяемые в ходе операции гидродинамические настройки хирургических систем (скорость аспирационного насоса, режим аспирации, уровень вакуума в аспирационной линии и целевое ВГД) были идентичны при всех степенях плотности ядра. Для раскола ядра использовали метод «Phaco Quick Chop». Имплантацию гибкой интраокулярной линзы осуществляли в капсульный мешок.

Контрольные осмотры пациентов в послеоперационном периоде для оценки клинико-функциональных показателей зрения, а также для оценки послеоперационных осложнений проводили на 1-е, 7-е и 30-е сутки, а также на 3-й и 6-й месяцах.

Для статистической обработки результатов использовали пакет программ SPSS ver. 27 (IBM Corporation; США). После проверки данных на нормальность распределения использовали параметрический *t*-критерий Стьюдента или непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни при статистической значимости различий двух независимых выборок ($p < 0,05$). При нормальном распределении данных результаты представляли в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm Sd$), в случае отличного от нормального распределения данных — в виде медианы и межквартильного размаха $Me (Q_1; Q_3)$. Дисперсионный анализ для связанных выборок проводили с применением критерия Фридмана ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинико-демографические данные пациентов представлены в табл. 2.

В обеих группах исследования к 30-м суткам после операции были отмечены высокие показатели МКОЗ ($0,86 \pm 0,13$ в основной группе, $0,83 \pm 0,16$ в контрольной группе). К 6-му месяцу послеоперационного наблюдения МКОЗ в основной группе составила $0,87 \pm 0,14$, в контрольной группе — $0,85 \pm 0,15$. Статистически значимые различия по данному показателю между группами отсутствовали ($p > 0,05$).

Основным осложнением раннего послеоперационного периода стал клинически значимый отек роговицы — в трех случаях в основной группе (7,9%) и в четырех случаях в контрольной (11,4%). Клинически значимый отек роговицы сопровождался снижением прозрачности роговицы, преимущественно в оптической зоне, утолщением стромы,

Таблица 2. Клинико-демографические данные пациентов в основной и контрольной группах исследования

Параметр	Основная группа (n = 38)	Контрольная группа (n = 35)
Возраст, М ± Sd	66,4 ± 7,8	68,7 ± 7,5
Пол мужской женский	15 (34,78%) 23 (65,22%)	16 (45,71%) 19 (54,29%)
Степень плотности катаракты по Буратто		
I	8 (21,05%)	7 (20,00%)
II	14 (36,84%)	13 (37,14%)
III	10 (26,32%)	9 (25,72%)
IV	6 (15,79%)	6 (17,14%)

а также формированием складок десцеметовой мембраны. Данное осложнение регрессировало под действием терапии к седьмым суткам послеоперационного периода.

Сравнение потерь эндотелиальных клеток роговицы, в соответствии с данными литературы, проводили на третьем и шестом месяцах послеоперационного периода, так как большинство офтальмологов придерживаются мнения, что восстановление дефектов эндотелия происходит, как правило, с третьего месяца после операции [28]. Результаты сравнения потерь эндотелиальных клеток между группами представлены в табл. 3.

По результатам сравнения процента потерь эндотелиоцитов между группами в послеоперационном периоде отмечены следующие особенности: среди пациентов с I степенью плотности катаракты статистически значимые различия через три месяца ($p = 0,206$) и шесть месяцев ($p = 0,155$) не обнаружены. Оценка потери эндотелиоцитов у пациентов со II степенью плотности катаракты также показала отсутствие статистически значимых межгрупповых различий через три ($p = 0,135$) и шесть ($p = 0,087$) месяцев после операции. Потеря эндотелиальных клеток роговицы у пациентов с III степенью плотности катаракты в основной группе было статистически значимо меньше на 3-й ($p = 0,012$) и 6-й ($p = 0,025$) месяцы послеоперационного наблюдения.

Таблица 3. Динамика потерь эндотелиоцитов роговицы в основной и контрольной группах через 3 и 6 месяцев после операции, % (Me (Q₁; Q₃))

Плотность катаракты	Основная группа		Контрольная группа	
	3-й месяц	6-й месяц	3-й месяц	6-й месяц
I	5,29 (4,88; 5,67)	5,49 (4,83; 6,25)	5,77 (5,29; 6,18)	5,86 (5,55; 6,32)
II	7,31 (6,63; 7,91)	7,42 (6,81; 8,03)	7,53 (7,31; 8,23)	7,79 (7,37; 8,49)
III	9,22 (8,16; 10,34)	9,83 (9,16; 10,42)	10,24 (9,69; 10,67)	10,59 (9,93; 11,35)
IV	10,72 (9,95; 11,62)	11,59 (9,86; 12,24)	11,78 (11,13; 12,59)	11,89 (10,42; 12,67)

Таблица 4. Послеоперационная динамика СГПД в основной и контрольной группах исследования, мм рт. ст. (M ± Sd)

Сроки наблюдения	Основная группа (n = 38)	Контрольная группа (n = 35)
До операции	52,44 ± 7,95	52,83 ± 8,83
1-е сутки	52,27 ± 8,80	52,53 ± 9,19
7-е сутки	52,59 ± 7,68	53,14 ± 8,77
30-е сутки	52,91 ± 7,48	53,29 ± 7,53
3 месяца	53,81 ± 6,78	53,70 ± 7,52
6 месяцев	54,54 ± 7,15	54,31 ± 7,66

Таблица 5. Послеоперационная динамика ОКТА-параметров макулярной зоны в основной группе (n = 25; M ± Sd)

Параметр	1-е сутки	7-е сутки	30-е сутки	3-й месяц	6-й месяц	p-value
Общая плотность ПСС, %	48,21 ± 4,39	50,73 ± 4,46	51,32 ± 4,80	51,48 ± 5,13	51,14 ± 5,05	$p = 0,113$
Общая плотность ГСС, %	46,98 ± 5,42	48,22 ± 5,02	49,63 ± 4,89	50,54 ± 5,58	51,02 ± 4,72	$p < 0,001^*$
Площадь ФАЗ, мм ²	0,296 ± 0,082	0,271 ± 0,079	0,270 ± 0,091	0,275 ± 0,068	0,274 ± 0,091	$p < 0,001^*$

Примечание: * — статистическая значимость по критерию Фрийдмана для связанных выборок.

Таблица 6. Послеоперационная динамика ОКТА-параметров макулярной зоны в контрольной группе (n = 25; M ± Sd)

Параметр	1-е сутки	7-е сутки	30-е сутки	3-й месяц	6-й месяц	p-value
Общая плотность ПСС, %	48,62 ± 5,02	50,49 ± 4,73	50,97 ± 5,11	51,09 ± 5,05	50,80 ± 4,69	p = 0,012*
Общая плотность ГСС, %	47,42 ± 4,89	48,93 ± 5,05	49,52 ± 4,73	50,49 ± 4,22	50,07 ± 4,84	p < 0,001*
Площадь ФАЗ, мм ²	0,281 ± 0,082	0,275 ± 0,101	0,270 ± 0,121	0,268 ± 0,186	0,269 ± 0,193	p = 0,206

Примечание: * — статистическая значимость по критерию Фридмана для связанных выборок.

уровне поверхностного и глубокого сосудистых сплетений макулярной области, а также площади ФАЗ не выявлены во все сроки исследования (p > 0,05).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что при факоземальсификации с новым способом адаптивного управления инфузией на базе хирургической системы «Оптимед Профи» отмечается сопоставимая динамика потери эндотелиоцитов роговицы с существующим способом управления инфузией на базе системы Centurion Vision System, несмотря на имеющиеся статистически значимые различия при отдельных межгрупповых сравнениях, которые не изменяли общую тенденцию.

Полученные результаты согласуются с данными литературы, где отмечены меньшие потери эндотелиальных клеток роговицы при использовании адаптивного управления инфузией при ФЭК по сравнению с применением традиционной инфузии гравитационного типа [29, 30]. Оценивая потери эндотелиальных клеток, необходимо учитывать многофакторность эндотелиальной травмы, причиной которой могут стать как механические, так и гидродинамические факторы [31]. Тем не менее, меньшие потери эндотелиальных клеток роговицы на 3-й и 6-й месяцы послеоперационного периода при использовании нового способа адаптивного управления инфузией можно связать с меньшей интраоперационной амплитудой постокклюзионных волн и сокращением

времени восстановления внутриглазного давления до целевого уровня, что было показано ранее в условиях тестовой среды [22].

Результаты нашего исследования по оценке МКОЗ в контрольной группе сопоставимы с данными зарубежного исследования, в котором МКОЗ (LogMAR) к 1-му месяцу после операции с применением существующего способа адаптивного управления инфузией (система Centurion Vision System с функцией Active Fluidics) составила 0,04, что соответствует остроте зрения 0,84–0,85 по десятичной системе [32].

Развитие у пациентов клинически значимого отека роговицы в раннем послеоперационном периоде является неспецифическим осложнением, которое встречалось с одинаковой частотой в обеих группах исследования преимущественно у пациентов с IV степенью плотности ядра. По нашему мнению, данное осложнение не имеет связи с работой гидродинамической составляющей хирургических систем, а его причиной могла стать работа на более высоком уровне мощности ультразвука у пациентов с плотной катарактой.

Полученное в обеих группах количественное значение СГПД согласуется с данными мировой литературы, согласно которым значение данного параметра после неосложненной ФЭК составляет 45–60 мм рт. ст. [33]. Несмотря на зависимость СГПД от вариабельности параметров АД и ВГД, увеличение показателя в послеоперационном периоде может косвенно свидетельствовать о функциональной гиперемии макулярной области [34].

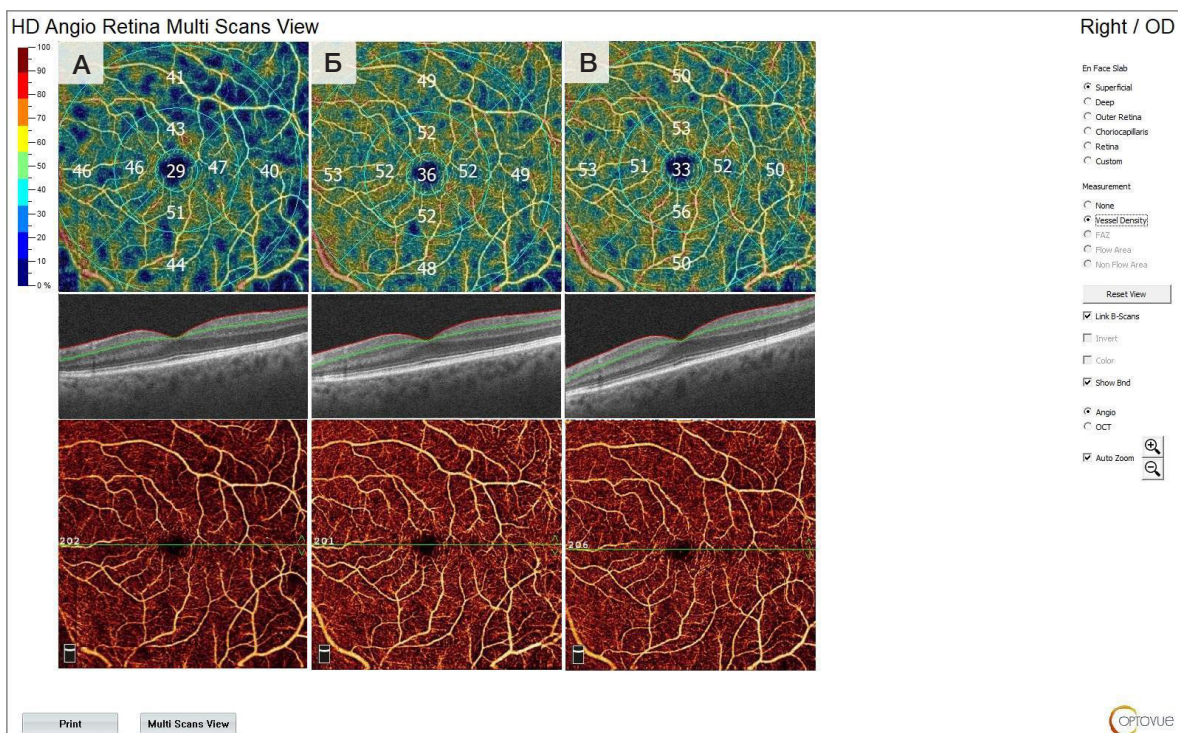


Рис. Увеличение общей сосудистой плотности макулярной области в основной группе по данным ОКТА-ангиографии в режиме Multi Scans: на 7-й день (А), на 3-й месяц (Б) и на 6-й месяц (В) после ФЭК

По результатам исследования данных ОКТА, в обеих группах исследования к 6-му месяцу после ФЭК были выявлены признаки функциональной гиперемии макулярной области в виде увеличения площади, занимаемой сосудами, а также снижения площади ФАЗ, что ранее описывалось в литературе [34]. Особенности изменения сосудистой плотности в макулярной зоне после ФЭК, как правило, связаны со снижением ВГД, внутриглазных факторов воспаления, а также лучшей сохранностью перфузии сетчатки [32].

Ограничением нашего исследования является использование различных хирургических систем в каждой из групп пациентов, что препятствует полной идентичности ультразвуковых параметров факомашин, а именно типа ультразвуковых колебаний. Однако в ранее проведенных исследованиях была доказана сопоставимость хирургических систем, использующих трехмерные и сочетание торсионных и продольных ультразвуковых колебаний в отношении режущей способности, удерживаемости фрагментов хрусталика, а также потерям эндотелиальных клеток в послеоперационном периоде [35, 36]. Сопоставимость гидродинамических настроек обеих хирургических систем была определена нами на доклинических этапах данного исследования в рамках медико-технических экспериментов при моделировании

ПОВ в идентичных условиях *in vitro* в тест-камере и *ex vivo* на сепаратных свиных глазах, а также *in vivo* при экспериментальных ФЭК на глазах лабораторных животных (кролики шиншиллы) [22].

Несмотря на ограничения, нами были подобраны наиболее приближенные к идентичным настройки обеих хирургических систем, которые можно считать оптимальными для обеих факомашин согласно рекомендациям производителей и данным литературы.

ВЫВОДЫ

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что использование нового способа адаптивного управления инфузией способствует эффективному выполнению факоэмульсификации катаракт различной плотности с меньшим процентом потери эндотелиальных клеток роговицы в отдаленном послеоперационном периоде с достижением высокой остроты зрения и низкой частотой послеоперационных осложнений. При применении нового и существующего способов адаптивного управления инфузии при факоэмульсификации отмечается увеличение среднего глазного перфузионного давления, а также сосудистой плотности макулярной области.

Литература

1. Аветисов С. Э., Юсеф Ю. Н., Юсеф С. Н., Аветисов К. С., Иванов М. Н., Фокина Н. Д. и др. Современные возможности хирургии старческой катаракты. Клиническая геронтология. 2017; (11–12): 84–96.
2. Куликов А. Н., Чурашов С. В., Даниленко Е. В., Шамрей Д. В. Сравнительная оценка вариантов хирургического лечения катаракты, осложненной слабостью связочного аппарата хрусталика. Офтальмология. 2020; 17 (3): 577–84.
3. Bourne R, Steinmetz J, Saylan M, Mersha A, Weldemariam A, Wondmeh T, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet Glob. Heal. 2021; 9 (2): e144–e160.
4. Шухаев С. В., Бойко Э. В. Сравнение плотности эндотелиальных клеток роговицы после факоэмульсификации плотной катаракты с использованием комбинированного ультразвука и торсионного ультразвука с Intelligent Phaco. Офтальмология. 2018; 2 (15): 145–52.
5. Лоскутов И. А., Федорова А. И. Факоэмульсификация с имплантацией ИОЛ при критическом уровне эндотелиальных клеток роговицы. Офтальмологические ведомости. 2023; 3 (16): 63–69.
6. Anwar N, Qasim MS. Effect of phacoemulsification surgery on central Macular thickness. Ann Med Health Sci Res. 2021; 11: 1536–9.
7. Bissen-Miyajima H, Weikert MP, Koch DD. Cataract surgery: Maximizing outcomes through research. Cataract Surgery: Maximizing Outcomes Through Research. Springer, 2014; 211 p.
8. Benjamin L. Fluidics and rheology in phaco surgery: What matters and what is the hype? Eye. Nature Publishing Group. 2018; 32 (2): 204–9.
9. Agarwal A, Agarwal A, Agarwal S. Air pump to prevent Surge. In: Agarwal S. Advances in Ophthalmology. Jaypee Brothers Medical Publishers, 2002; 3000 p. DOI: 10.5005/jp/books/10033_13.
10. Pérez-Arteaga A. Anterior vented gas forced infusion system of the Accurus surgical system in phakonit. Journal of cataract and refractive surgery. 2004; 30 (4): 933–35.
11. Jensen D, Jensen B, Boulter B, Nathan G, Lambert B, Zaugg B, et al. Intraocular pressure study using monitored forced-infusion system phacoemulsification technology. J Cataract Refract Surg. 2016; 42 (5): 768–71.
12. Hopkins MA, inventor., Novartis AG inc. Aspiration control via flow or impedence: United States patent 8246580 B2. 2012; p. 1–5.
13. Hajjshah A, inventor, Abbott Medical Optics inc. Advanced occlusion management methods for a phaco system: United States patent US 2019/0099526 A1. 2019; (1): 1–24.
14. Mehta D, inventor, Johnson & Johnson Surgical Vision inc. System, apparatus and method for monitoring anterior chamber intraoperative intraocular pressure: United States patent US 11071816. 2021; p. 6.
15. Gordon R, inventor, Alcon Research Ltd. Pressure control in phacoemulsification: United States patent US 9119701 B2. 2015; p. 13.
16. Peterson J, Cooper C, Ungricht E. Measurement of phacoemulsification vacuum pressure in the Oertli CataRhex3. Clinical Ophthalmology. 2022; 16 (April): 1731–7.
17. Miller KM, Dyk D, Yalamanchili S. Experimental study of occlusion break surge volume in 3 different phacoemulsification systems. Journal of cataract and refractive surgery. 2021; 47 (11): 1466–72.
18. Kim YJ, Park SH, Choi KS. Fluctuation of infusion pressure during microincision vitrectomy using the constellation vision system. Retina. 2015; 35 (12): 2529–36.
19. Thorne A, Dyk A, Fanney D, Miller D, Kevin M. Phacoemulsifier occlusion break surge volume reduction. J Cataract Refract Surg. United States. 2018; 44 (12): 1491–6.
20. Zhou J, Han D. Post-occlusion surge and anterior chamber stability in a new phacoemulsification machine with small-bore, dual-durometer aspiration tubing. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2021; 62: 574.
21. Азнабаев Б. М., Мухаммадеев Т. Р., Дибаяв Т. И. Исмагилов Т. Н., авторы; ЗАО «Оптимедсервис», патентообладатель. Способ адаптивного управления инфузией во время факоэмульсификации. Патент РФ № 2788289 С1. 17.01.2023.
22. Исмагилов Т. Н., Азнабаев Б.М., Мухаммадеев Т. Р., Дибаяв Т. И. Количественная оценка постокклюзионной волны при факоэмульсификации с новым способом адаптивного управления инфузией. Современные проблемы науки и образования. 2023; 2: 73.

23. Buratto L. Phacoemulsification/ SLACK. 1998; 544 pp.
24. Rossi T, Querzoli G, Gelso A, Angelini G, Rossi A, Corazza P. Ocular perfusion pressure control during pars plana vitrectomy: testing a novel device. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017; 255 (12): 2325–30.
25. Zhao Z, Yu X, Yang X, Zhang J, Zhang D, Sun N. Elevated intraocular pressure causes cellular and molecular retinal injuries, advocating a more moderate intraocular pressure setting during phacoemulsification surgery. *Int Ophthalmol Springer Netherlands*. 2020; 40 (12): 3323–36.
26. Malik PK, Dewan T, Patidar A, Kr Sain E. Effect of IOP based infusion system with and without balanced phaco tip on cumulative dissipated energy and estimated fluid usage in comparison to gravity fed infusion in torsional phacoemulsification. *Eye Vis. London*. 2017; 4: 22.
27. Boukhny M, Mackool RJ, Lindstrom RL. Cataract & Refractive surgery today. The Centurion Vision System: the next step in cataract surgery. 2014; pp. 1–8.
28. Малюгин Б. Э. Медико-технологическая система хирургической реабилитации пациентов с катарактой на основе ультразвуковой фактоэмульсификации с имплантацией интраокулярной линзы [диссертация]. М., 2002.
29. Chaudhry P, Prakash G, Jacob S. Safety and efficacy of gas-forced infusion (air pump) in coaxial phacoemulsification. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2010; 36 (12): 2139–45.
30. Sorrentino FS, Matteini S, Imburgia A. Torsional phacoemulsification: a pilot study to revise the “harm scale” evaluating the endothelial damage and the visual acuity after cataract surgery. *PloS One*. 2017; 12 (10): e0186975.
31. Nayak BK, Shukla RO. Effect on corneal endothelial cell loss during phacoemulsification: fortified balanced salt solution versus Ringer lactate. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2012; 38 (9): 1552–8.
32. Luo Y, Li H, Chen W. Active-fluidics versus gravity-fluidics system in phacoemulsification for age-related cataract (AGSPC): study protocol for a prospective, randomised, double-blind, controlled clinical trial. *BMJ open*. 2022; 12 (1): e059062.
33. Kim M, Kim S, Kwon H, Koh H, Lee S. Association between choroidal thickness and ocular perfusion pressure in young, healthy subjects: Enhanced depth imaging optical coherence tomography study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53 (12): 7710–7.
34. Križanović A, Bjeloš M, Bušić M, Elabjer, Kuzmanović B, Rak B. Macular perfusion analysed by optical coherence tomography angiography after uncomplicated phacoemulsification: benefits beyond restoring vision. *BMC Ophthalmol*. 2021; 21 (1): 1–11.
35. Дибаяев Т. И., Рамазанов В. Н., Рахимов А. Ф. Оценка режущей способности отечественного ультразвукового инструмента для фактоэмульсификации, основанного на непродольных колебаниях. *Современные технологии в офтальмологии*. 2015; 3: 61–63.
36. Азнабаев Б. М., Мухаммадеев Т. Р., Дибаяев Т. И. Клинические результаты ультразвуковой фактоэмульсификации на основе трехмерных колебаний. *Современные технологии в офтальмологии*. 2015; 4: 11–14.

References

1. Avetisov SJe, Jusef JuN, Jusef SN, Avetisov KS, Ivanov MN, Fokina ND, i dr. *Sovremennye vozmozhnosti hirurgii starcheskoj katarakty. Klinicheskaja gerontologija*. 2017; (11–12): 84–96. Russian.
2. Kulikov AN, Churashov SV, Danilenko EV, Shamrej DV. *Sravnitel'naja ocenka variantov hirurgicheskogo lechenija katarakty, oslozhnennoj slabost'ju svjazochnogo apparata hrustalika. Oftal'mologija*. 2020; 17 (3): 577–84. Russian.
3. Bourne R, Steinmetz J, Saylan M, Mersha A, Weldemariam A, Wondmeneh T, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob. Heal*. 2021; 9 (2): e144–e160.
4. Shuhaev SV, Bojko JeV. *Sravnienie plotnosti jendotelial'nyh kletok rogovicy posle fakojemul'sifikacii plotnoj katarakty s ispol'zovaniem kombinirovannogo ul'trazvuka i torsionnogo ul'trazvuka s Intelligent Phaco. Oftal'mologija*. 2018; 2 (15): 145–52. Russian.
5. Loskutov IA, Fedorova AI. *Fakojemul'sifikacija s implantaciej IOL pri kriticheskom urovne jendotelial'nyh kletok rogovicy. Oftal'mologicheskie vedomosti*. 2023; 3 (16): 63–69. Russian.
6. Anwar N, Qasim MS. Effect of phacoemulsification surgery on central Macular thickness. *Ann Med Health Sci Res*. 2021; 11: 1536–9.
7. Bissen-Miyajima H, Weikert MP, Koch DD. *Cataract surgery: Maximizing outcomes through research. Cataract Surgery: Maximizing Outcomes Through Research*. Springer, 2014; 211 p.
8. Benjamin L. Fluidics and rheology in phaco surgery: What matters and what is the hype? *Eye. Nature Publishing Group*. 2018; 32 (2): 204–9.
9. Agarwal A, Agarwal A, Agarwal S. Air pump to prevent Surge. In: Agarwal S. *Advances in Ophthalmology*. Jaypee Brothers Medical Publishers, 2002; 3000 p. DOI: 10.5005/jp/books/10033_13.
10. Pérez-Arteaga A. Anterior vented gas forced infusion system of the Accurus surgical system in phakonit. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2004; 30 (4): 933–35.
11. Jensen D, Jensen B, Boulter B, Nathan G, Lambert B, Zaugg B, et al. Intraocular pressure study using monitored forced-infusion system phacoemulsification technology. *J Cataract Refract Surg*. 2016; 42 (5): 768–71.
12. Hopkins MA, inventor., Novartis AG inc. Aspiration control via flow or impedance: United States patent 8246580 B2. 2012; p. 1–5.
13. Hajishah A, inventor, Abbott Medical Optics inc. Advanced occlusion management methods for a phaco system: United States patent US 2019/0099526 A1. 2019; (1): 1–24.
14. Mehta D, inventor, Johnson & Johnson Surgical Vision inc. System, apparatus and method for monitoring anterior chamber intraoperative intraocular pressure: United States patent US 11071816. 2021; p. 6.
15. Gordon R, inventor, Alcon Research Ltd. Pressure control in phacoemulsification: United States patent US 9119701 B2. 2015; p. 13.
16. Peterson J, Cooper C, Ungricht E. Measurement of phacoemulsification vacuum pressure in the Oertli CataRhex3. *Clinical Ophthalmology*. 2022; 16 (April): 1731–7.
17. Miller KM, Dyk D, Yalamanchili S. Experimental study of occlusion break surge volume in 3 different phacoemulsification systems. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2021; 47 (11): 1466–72.
18. Kim YJ, Park SH, Choi KS. Fluctuation of infusion pressure during microincision vitrectomy using the constellation vision system. *Retina*. 2015; 35 (12): 2529–36.
19. Thorne A, Dyk A, Fanney D, Miller D, Kevin M. Phacoemulsifier occlusion break surge volume reduction. *J Cataract Refract Surg. United States*. 2018; 44 (12): 1491–6.
20. Zhou J, Han D. Post-occlusion surge and anterior chamber stability in a new phacoemulsification machine with small-bore, dual-durometer aspiration tubing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021; 62: 574.
21. Aznabaev BM, Muhamadeev TR, Dibaev TI, Ismagilov TN, avtory; ZAO «Optimedservis», patentoobladatel'. *Sposob adaptivnogo upravlenija infuziej vo vremja fakojemul'sifikacii*. Patent RF # 2788289 S1. 17.01.2023. Russian.
22. Ismagilov TN, Aznabaev BM, Muhamadeev TR, Dibaev TI. *Kolichestvennaja ocenka postokkjuzionnoj volny pri fakojemul'sifikacii s novym sposobom adaptivnogo upravlenija infuziej. Sovremennye problemy nauki i obrazovanija*. 2023; 2: 73. Russian.
23. Buratto L. Phacoemulsification/ SLACK. 1998; 544 pp.
24. Rossi T, Querzoli G, Gelso A, Angelini G, Rossi A, Corazza P. Ocular perfusion pressure control during pars plana vitrectomy: testing a novel device. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017; 255 (12): 2325–30.
25. Zhao Z, Yu X, Yang X, Zhang J, Zhang D, Sun N. Elevated intraocular pressure causes cellular and molecular retinal injuries, advocating a more moderate intraocular pressure setting during

- phacoemulsification surgery. *Int Ophthalmol* Springer Netherlands. 2020; 40 (12): 3323–36.
26. Malik PK, Dewan T, Patidar A, Kr Sain E. Effect of IOP based infusion system with and without balanced phaco tip on cumulative dissipated energy and estimated fluid usage in comparison to gravity fed infusion in torsional phacoemulsification. *Eye Vis*. London. 2017; 4: 22.
 27. Boukhny M, Mackool RJ, Lindstrom RL. *Cataract & Refractive surgery today. The Centurion Vision System: the next step in cataract surgery*. 2014; pp. 1–8.
 28. Maljugin BJe. Mediko-tehnologicheskaja sistema hirurgicheskoy reabilitacii pacientov s kataraktoj na osnove ul'trazvukovoj fakojemul'sifikacii s implantaciej intraokuljarnoj linzy [dissertacija]. M., 2002. Russian.
 29. Chaudhry P, Prakash G, Jacob S. Safety and efficacy of gas-forced infusion (air pump) in coaxial phacoemulsification. *Journal of Cataract and Refractive Surgery*. 2010; 36 (12): 2139–45.
 30. Sorrentino FS, Matteini S, Imburgia A. Torsional phacoemulsification: a pilot study to revise the “harm scale” evaluating the endothelial damage and the visual acuity after cataract surgery. *PLoS One*. 2017; 12 (10): e0186975.
 31. Nayak BK, Shukla RO. Effect on corneal endothelial cell loss during phacoemulsification: fortified balanced salt solution versus Ringer lactate. *Journal of cataract and refractive surgery*. 2012; 38 (9): 1552–8.
 32. Luo Y, Li H, Chen W. Active-fluidics versus gravity-fluidics system in phacoemulsification for age-related cataract (AGSPC): study protocol for a prospective, randomised, double-blind, controlled clinical trial. *BMJ open*. 2022; 12 (1): e059062.
 33. Kim M, Kim S, Kwon H, Koh H, Lee S. Association between choroidal thickness and ocular perfusion pressure in young, healthy subjects: Enhanced depth imaging optical coherence tomography study. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53 (12): 7710–7.
 34. Križanović A, Bjeloš M, Bušić M, Elabjer, Kuzmanović B, Rak B. Macular perfusion analysed by optical coherence tomography angiography after uncomplicated phacoemulsification: benefits beyond restoring vision. *BMC Ophthalmol*. 2021; 21 (1): 1–11.
 35. Dibaev TI, Ramazanov VN, Rahimov AF. Ocenka rezhushhej sposobnosti otechestvennogo ul'trazvukovogo instrumenta dlja fakojemul'sifikacii, osnovannogo na neprodol'nyh kolebanijah. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*. 2015; 3: 61–63. Russian.
 36. Aznabaev BM, Muhamadeev TR, Dibaev TI. Klinicheskie rezul'taty ul'trazvukovoj fakojemul'sifikacii na osnove trehmernyh kolebanij. *Sovremennye tehnologii v oftal'mologii*. 2015; 4: 11–14. Russian.